

(19)



Europäisches Patentamt

European Patent Office

Office européen des brevets



(11)

**EP 0 739 988 A1**

(12)

**EUROPÄISCHE PATENTANMELDUNG**

(43) Veröffentlichungstag:  
30.10.1996 Patentblatt 1996/44

(51) Int. Cl.<sup>6</sup>: **C12Q 1/68**, C12P 19/34,  
C07H 21/04

(21) Anmeldenummer: 96106728.7

(22) Anmeldetag: 29.04.1996

(84) Benannte Vertragsstaaten:  
AT BE CH DE ES FR GB IE IT LI NL SE

(30) Priorität: 29.04.1995 DE 19515891

(71) Anmelder: **BOEHRINGER MANNHEIM GMBH**  
68298 Mannheim (DE)

(72) Erfinder:

- Heidrich, Björn  
10783 Berlin (DE)
- Robinson, Peter-Nicholas, Dr.  
10629 Berlin (DE)
- Tiecke, Frank  
13057 Berlin (DE)
- Rolfs, Arndt, Dr.  
10999 Berlin (DE)

(54) **Verfahren zur Gattungs- und speziesspezifische Identifizierung von Legionellen**

(57) Verfahren zur gattungsspezifischen Amplifikation von Legionellen und gattungsspezifische oder speziesspezifische Identifizierung.

**EP 0 739 988 A1**

## Beschreibung

Gegenstand der Erfindung sind Verfahren zur Amplifikation von Nukleinsäuren der Gattung *Legionella* und Verfahren zum gattungs- und speziesspezifischen Nachweis von Bakterien der Gattung *Legionella* sowie dafür geeigneter Reagenzien.

Legionellen sind aquatische, ubiquitäre gramnegative aerobe, fakultativ intrazelluläre stäbchenförmige Bakterien. Die Familie Legionellaceae besteht aus einer Gattung (*Legionella*) mit derzeit 48 bekannten Spezies und 51 Serogruppen. Von der wichtigsten Spezies *L. pneumophila* existieren 16 bekannte Serovare. Unter ihren wichtigsten Reservoiren sind Wasserleitungen, Klimaanlage und Kühltürme. Die Infektion des Menschen erfolgt über legionellenhaltige Aerosole. Die Legionellose tritt häufig als Epidemie, z. B. über Duschköpfe aus Warmwasseranlagen, kontaminiertes Kühlwasser in Klimaanlage, oder sporadisch auf Eine Mensch-zu-Mensch-Übertragung ist bisher nicht beschrieben.

Legionellen-Infektionen lassen sich in zwei Gruppen unterteilen: Die Legionärskrankheit, eine akute, schwere, oft mit hohem Fieber, abdominellen Beschwerden, Kopfschmerzen, Myalgien und Verwirrheitszuständen und anderen neurologischen Symptomen einhergehende atypische Pneumonie sowie das Pontiac-Fieber, eine mit grippeähnlichen Symptomen verlaufende selbstlimitierende Variante der Legionellose.

Die wichtigste Serogruppe von *L. pneumophila*, ist *L. pneumophila* Serogruppe 1 (*L. pn. Sero. 1*) als dem mit ca. 80 % häufigsten Erreger der Legionärskrankheit. Es existieren aber große regionale Unterschiede, insbesondere bei den nosokomial erworbenen Legionellosen. Im Gegensatz dazu werden bei Pontiac-Fieber überwiegend *L. micdadei* und andere Non-Pneumophila-Spezies als kausales Agens beschrieben.

Die Labordiagnostik der Legionellen ist schwierig. Legionellen können nur schlecht mit Fuchsin angefärbt werden, so daß man die Erreger mit der Gram-Färbung praktisch nicht darstellen kann. Legionellen wachsen nicht auf üblichen Kulturmedien, sondern nur auf Spezialnährböden und einer Atmosphäre, die 2,5 - 5 % CO<sub>2</sub> enthält. Die Sensitivität der Kultur ist nur ca. 20 % für *L. pneumophila* und ca. 5 % für andere Spezies.

Zum Nachweis von Legionellen wurden unter anderem DNS-DNS-Hybridisierungen, Pulsfeld-Elektrophorese, Ribotyping, Restriktionsfragment-Längenpolymorphismen, Fettsäure- und Ubichinon-Analysen, rRNS-Sequenzierung, RT-PCR und Southern Blot, Latex-Agglutination, Fourier-transformierte Infrarotspektroskopie, indirekte Immunfluoreszenz und Kohlenhydratutilisation (BIOLOG-System) angewandt.

In Med. Microbiol. Lett. 1994; 3: 279-290 und Clin. Lab. 1994; 40: 211-216 ist die Sequenzierung von 5S-rDNS von Legionellen beschrieben.

Auf dem Markt ist ein Kit zum Nachweis von Legionellen in Wasserproben erhältlich. Bei einem Nachweisverfahren mit Hilfe dieses Kits wird in einem ersten Schritt ein Fragment der 5S-rDNS genusspezifisch amplifiziert. In demselben Gefäß wird ein Fragment des MIP-Gens der Spezies *L. pneumophila* amplifiziert. Der Kit enthält insgesamt 7 Primer zur Durchführung einer sogenannten Multiplex-PCR unter Herstellung zweier PCR-Amplifikate. Anschließend erfolgt die Detektion der Amplifikate durch Reverse Dot Blot. Das in diesem Kit realisierte Verfahren ist wegen der Notwendigkeit des Einsatzes einer großen Anzahl von Primern komplex und in der Herstellung aufwendig. Darüber hinaus ist das bekannte Verfahren im Hinblick auf die Sensitivität unbefriedigend.

Aufgabe der vorliegenden Erfindung war daher die Bereitstellung von Reagenzien, die den Nachweis von Legionellen einfacher gestalten und die weniger Komponenten beinhalten. Eine weitere Aufgabe war es, spezifischere und potentiell variable Legionellen-nachweise zur Verfügung zu stellen.

Gegenstand der Erfindung ist daher in einem ersten Aspekt ein Verfahren zur Amplifikation von Nukleinsäuren der Gattung *Legionella*, in dem mit weniger als 7 Primern Nukleinsäuren aller möglichen Spezies der Gattung *Legionella* amplifiziert werden.

Ein weiterer Gegenstand der Erfindung ist ein Nachweisverfahren unter Verwendung des oben genannten Amplifikationsverfahrens.

Ein weiterer Gegenstand der Erfindung ist ein Verfahren zum Nachweis von Bakterien der Gattung *Legionella* unter Verwendung einer Nukleinsäuresonde, welche eine mindestens 15 Basen lange Sequenz aufweist, die zu mindestens 90 % homolog zu einem Teil der SEQ. ID. NO. 1 ist oder die zu mindestens 90 % komplementär zu einem Teil der SEQ. ID. NO. 1 ist.

Kern der Erfindung ist, daß Sequenzen auf dem *Legionella*-Genom lokalisiert wurden, die das Entwerfen von Nukleinsäuresonden erlauben, die zum Nachweis aller bislang den Legionellen zugeordneten Spezies der Gattung *Legionella* verwendet werden können.

Unter Amplifikation wird die Erhöhung der Konzentration der in einem Reaktionsgemisch vorhandenen Nukleinsäuren oder Teilen davon verstanden. Beispiele für solche Amplifikationsverfahren sind die Polymerase-Kettenreaktion gemäß EP-B-0 201 184, das sogenannte NASBA-Verfahren gemäß EP-A-0 329 822 sowie davon abgeleitete Verfahren.

Bei dem Verfahren der EP-A-0 201 184 wird die zu amplifizierende Nukleinsäure, die einzelsträngig vorliegt oder einzelsträngig gemacht wird, mit einem molaren Überschuß zweier Oligonukleotid-Primer unter Hybridisierungsbedingungen und in Gegenwart eines induzierenden Agens für die Polymerisation und Nukleotiden behandelt, wobei die Primer so gewählt werden, daß für jeden Strang ein zum Nukleinsäurestrang komplementäres Verlängerungsprodukt des

betreffenden Primers synthetisiert wird, und daß ein Verlängerungsprodukt eines Primers, wenn es von seinem Komplement getrennt ist, als Matrize zur Synthese eines Verlängerungsprodukts des anderen Primers dienen kann, Trennen der Verlängerungsprodukte von den Matrizen, an denen sie synthetisiert wurden, und Verwendung der gebildeten Verlängerungsprodukte zur erneuten Umsetzung mit den Primern. Durch die zyklische Wiederholung der Schritte

5 ergibt sich eine theoretisch exponentielle Vermehrung einer Nukleinsäuresequenz, die innerhalb der äußeren Hybridisierungspositionen der Primer liegt.

Bei dem Verfahren gemäß EP-A-0 329 822 wird eine Primerkonstruktion zur Erzeugung einer doppelsträngigen Nukleinsäure verwendet, in der die zu amplifizierende Nukleinsäuresequenz funktionell an einen Promotor gebunden ist. Hierzu weist einer der Primer mindestens einen Strang einer Promotorregion auf. Der intermediär gebildete Transkriptionskomplex wird Bedingungen unterworfen, unter denen unter der Kontrolle des Promotors Ribonukleinsäuren unter Verwendung der zu amplifizierenden Nukleinsäure als Matrize gebildet werden. Die gebildeten Ribonukleinsäuren werden erneut zur Bildung jeweils eines neuen transkribierbaren Nukleinsäurekomplexes verwendet. Ein Vorteil dieses Systems ist, daß es isotherm geführt werden kann.

Unter Multiplex-PCR wird ein Verfahren gemäß EP-A-0 364 255 verstanden. Nach diesem Verfahren werden in einer Eintopfreaktion durch geeignete Anordnung der Hybridisierungspositionen einer Vielzahl von Primern bestimmte Fragmente von Nukleinsäuren amplifiziert, die meist unterschiedliche Länge und Position im Genom aufweisen.

Bei dem erfindungsgemäßen Verfahren handelt es sich um eine spezielle Ausführungsform der sogenannten Hybridisierungstests, die in ihren Grundzügen dem Fachmann auf dem Gebiet der Nukleinsäurediagnostik bekannt sind. Soweit experimentelle Details im folgenden nicht ausgeführt sind, wird dazu vollinhaltlich auf "Nucleic acid hybridisation", Herausgeber B.D. Hames und S.J. Higgins, IRL Press, 1986, insbesondere in den Kapiteln 1 (Hybridisation Strategy), 3 (Quantitative Analysis of Solution Hybridisation) und 4 (Quantitative Filter Hybridisation), Current Protocols in Molecular Biology, Edt. F.M. Ausubel et al., J. Wiley and Son, 1987, insbesondere 2.9.1 - 2.9.10 und Molecular Cloning, Edt. J. Sambrook et al., CSH, 1989, insbesondere 9.4.7 - 9.5.8, Bezug genommen. Dazu gehören insbesondere die bekannten Methoden zur Herstellung von markierten Nukleosidtriphosphaten, wie sie auch in EP-A-0 329 474 beschrieben sind, die chemische Synthese von modifizierten und unmodifizierten Oligonukleotiden, die Spaltung von Nukleinsäuren mittels Restriktionsenzymen, die Auswahl von Hybridisierungsbedingungen, durch welche eine Spezifität erreicht werden kann, die vom Ausmaß der Homologie zwischen den zu hybridisierenden Nukleinsäuren, deren GC-Gehalt und deren Länge abhängt, sowie die Bildung von Nukleinsäuren aus Nukleosidtriphosphaten mit Hilfe von Polymerasen, gegebenenfalls unter Verwendung von sogenannten Primern.

Eine Markierung im Sinne der vorliegenden Erfindung besteht aus einer direkt oder indirekt nachweisbaren Gruppe. Direkt nachweisbare Gruppen sind beispielsweise radioaktive ( $^{32}\text{P}$ ), farbige oder fluoreszierende Gruppen oder Metallatome. Indirekt nachweisbare Gruppen sind beispielsweise immunologisch oder enzymatisch wirksame Verbindungen, wie Antikörper, Antigene, Haptene oder Enzyme oder enzymatisch aktive Teilenzyme. Diese werden in einer nachfolgenden Reaktion oder Reaktionssequenz detektiert. Besonders bevorzugt sind Haptene, da mit ihnen markierte Nukleosidtriphosphate (rNTP oder dNTP) im allgemeinen besonders gut als Substrate von (RNS- bzw. DNS-) Polymerasen einsetzbar sind und eine anschließende Reaktion mit einem markierten Antikörper gegen das Hapten oder das haptenisierte Nukleosid leicht vorgenommen werden kann. Solche Nukleosidtriphosphate sind beispielsweise Brom-Nukleosidtriphosphate oder Digoxigenin-, Digoxin- oder Fluorescein-gekoppelte Nukleosidtriphosphate. Als besonders geeignet haben sich die in EP-A-0 324 474 genannten Steroide und deren Detektion erwiesen. Für deren Inkorporation in Nukleinsäuren wird hiermit auf die EP-A-0 324 474 verwiesen.

Unter den Nukleinsäuren, die zur Verwendung des erfindungsgemäßen Amplifikations- und Nachweisverfahrens für Legionellen verwendet werden können, werden insbesondere genomische Nukleinsäuren verstanden. Genomische Nukleinsäuren enthalten unter anderem auch die Gene, welche für die ribosomale RNS (rRNS) codieren, sowie eine Reihe von Spacersequenzen. Diese werden nach der Größe der rRNS, für die sie codieren, benannt. In Legionellen-genomen sind in dieser Reihenfolge das 16S-rRNS-Gen, das 23S-rRNS-Gen und das 5S-rRNS-Gen angeordnet. Diese Gene sind durch sogenannte Spacerregionen voneinander getrennt.

SEQ. ID. NO. 1 offenbart eine Nukleotidsequenz, die Ähnlichkeiten mit der in Spezies der Gattung Legionella enthaltenen genomischen Sequenz aufweist, die aneinander angrenzende Bereiche der 23S-rRNS, der Spacerregion zwischen 5S-rRNS- und 23S-rRNS- und des 5S-rRNS-Bereiches einschließt. Die SEQ. ID. NO. 1 schließt nur einen relativ kleinen Teil der 23S-rRNS jedoch die vollständige Spacerregion und ca. 80 % der 5S-rRNS ein.

SEQ. ID. NO. 1 stellt eine Nukleotidsequenz dar, aus welcher Teilsequenzen entnommen werden können, die gattungsspezifisch für Legionella sind.

Im Sinne der vorliegenden Erfindung soll der Begriff Nukleinsäuresonde nicht im Hinblick auf die Funktion einschränkend betrachtet werden. Die oben genannten Eigenschaften sind maßgebend. Insbesondere sollen zu den Nukleinsäuresonden auch die sogenannten Probes oder Nachweissonden gezählt werden, deren Hybridisierung mit den in der Probe vorhandenen Legionellannukleinsäuren als Maß für die Anwesenheit des Bakteriums nachgewiesen werden kann. Dazu kann die Nukleinsäuresonde bevorzugt weitere Teile enthalten, die den Nachweis oder die Amplifikation nicht wesentlich nachteilig beeinflussen. Zu solchen Molekülteilen gehören beispielsweise Markierungen zum Nachweis der Sonden, bzw. Hybriden, die diese Sonde enthalten, Gruppen, welche eine Immobilisierung der Nuklein-

säuresonde an eine feste Phase erlauben, feste Phasen als solche (z. B. Beads oder Oberflächen, z. B. von Reagenz- oder Detektionsgefäßen) oder weitere, nicht mit Legionella-Sequenzen interferierende Nukleotidsequenzen. Die Ausgestaltung der Nukleinsäuresonde richtet sich daher insbesondere nach der Art, wie der Nachweis der Legionella-Nukleinsäuren geführt werden soll.

5 Unter einer Nukleinsäuresonde wird ein Molekül mit einer festgelegten Aufeinanderfolge von Basen verstanden, welches in der Lage ist, mit natürlichen Nukleinsäuren Hybride aufgrund von Basen-Basen-Wechselwirkungen zu bilden. Hierzu gehören natürliche und artifizielle Nukleinsäuren. Die artifiziellen Nukleinsäuren unterscheiden sich von den natürlichen Nukleinsäuren dadurch, daß sie entweder im Basenteil (z. B. durch Verwendung von Basenanaloga, z. B. 7-deaza-dGTP) oder im Grundgerüst (Ersatz der Zucker- oder/und Phosphateinheiten durch andere chemische

10 Molekülteile, z. B. Peptide) modifiziert sind. Derartige künstliche Nukleinsäuren sind beispielsweise auch die in WO 92/20702 beschriebenen Peptidnukleinsäuren (PNA). Wesentlich für die korrekte Funktionsweise der Nukleinsäuresonden ist die spezifische Basenpaarung, wodurch die Selektivität der Sonden erreicht wird. Besonders bevorzugt besteht eine Nukleinsäuresonde aus Desoxyribonukleinsäure (DNS).

Unter einer Nukleinsäuresonde werden auch die sogenannten Primer verstanden, welche nach Hybridisierung mit

15 Legionella-Nukleinsäuren unter Verwendung eines Enzyms verlängert werden können. Typische Verlängerungsreaktionen sind beispielsweise die Anhängung von Mononukleosidtriphosphateinheiten durch DNS-Polymerasen (z. B. E. coli DNS-Polymerase, Klenow-Fragment oder Thermus aquaticus-Polymerase) unter Verwendung der Legionella-Nukleinsäuren als Matrize. In diesem Fall wird mit den bislang bekannten Enzymen das 3'-Ende des Primers verlängert. Eine weitere Verlängerungsreaktion ist die Ligase-Reaktion, bei der die Nukleinsäuresonde mit einem weiteren

20 Oligonukleotid enzymatisch verknüpft wird (z. B. EP-A-0 320 308). Zwischen der Polymerase- und der Ligasereaktion sind Mischformen bekannt (z. B. WO 90/01069).

Unter einer für Legionella gattungsspezifischen Nukleinsäuresonde wird eine Nukleinsäure verstanden, die mit einer Nukleinsäure hybridisiert, die eine Nukleotidsequenz gemäß SEQ. ID. NO. 1 bzw. deren Komplement enthält, oder die mit allen der in Tabelle 1 genannten Legionellenspezies unter denselben Stringensbedingungen hybridisiert.

25 Besonders bevorzugt hybridisieren diese Nukleinsäuren mit allen möglichen Spezies der Gattung Legionella.

Die gattungsspezifischen Sequenzen liegen bei der Sequenz der FIG 1 bevorzugt im 23S- und/oder 5S-Bereich; wenngleich es bei geschickter Wahl der Hybridisierungsbedingungen auch möglich ist, gattungsspezifische Sonden auch im Spacer-Bereich zu entwerfen.

30

35

40

45

50

55

Tab. 1

Erwartete Amplifikatlängen 23S-5S-Spacer-Region bei Verwendung von Primerpaar B/D

Species/ Serogroup	ATCC No. (NCTC)	Stamm	Amplikonlänge/ komplette bestimmte Länge der Sequenz	EMBL Accession Number	SEQ ID. NO.
L. pneumophila sero 1	33152	Philadelphia-1	232bp/336bp	Z30431	26
L. pneumophila sero 1	33153	Knoxville-1	232bp/336bp	Z30432	27
L. pneumophila sero 1	43108	Benidorm 030E	232bp/336bp	Z30433	28
L. pneumophila sero 1	43112	France 5811	232bp/336bp	Z30534	29
L. pneumophila sero 1	43109	OLDA	232bp/336bp	Z30434	30
L. pneumophila sero 1	43110	Oxford 4032E	231bp/335bp	Z30435	31
L. pneumophila sero 1	43113	Camperdown-1	232bp/336bp	Z30435	32
L. pneumophila sero 2	33154	Togus-1	232bp/336bp	Z30437	33
L. pneumophila sero 3	33155	Bloomington-2	232bp/336bp	Z30438	34
L. pneumophila sero 4	33156	Los Angeles-1	232bp/336bp	Z30439	35
L. pneumophila sero 4	n.a.	Portland	232bp/336bp	Z30440	36
L. pneumophila sero 5	33216	Dallas-1E	232bp/336bp	Z30441	37
L. pneumophila sero 5	(11417)	Cambridge-2	232bp/336bp	Z30442	38
L. pneumophila sero 6	33215	Chicago-2	232bp/336bp	Z30443	39
L. pneumophila sero 7	33823	Chicago-8	232bp/336bp	Z30444	40
L. pneumophila sero 8	35096	Concord-3	232bp/336bp	Z30445	41
L. pneumophila sero 9	35289	IN-23-G1-C2	232bp/336bp	Z30446	42
L. pneumophila sero 10	43283	Leiden-1	232bp/336bp	Z30447	43
L. pneumophila sero 11	43130	797-PA-H	232bp/336bp	Z30448	44
L. pneumophila sero 12	43290	570-CO-H	232bp/336bp	Z30449	45
L. pneumophila sero 13	43736	82 A 3105	232bp/336bp	Z30450	46
L. pneumophila sero 14	43073	1169-MN-H	232bp/336bp	Z30451	47
L. anisa	35292	WA-316-C3	267bp/371bp	Z30535	48
L. brunensis	n.a.	n.a.	246bp/350bp	Z30536	49
L. cherrii	35252	ORW	258bp/362bp	Z30537	50
L. cincinnatiensis	43753	72-OH-H	213bp/317bp	Z30452	51
L. dumoffii	33279	NY-23	255bp/359bp	Z30538	52
L. erythra	35303	SE-32A-C8	201bp/325bp	Z30453	53
L. feeleyi sero 1	35072	WO-44C	238bp/342bp	Z30454	54
L. feeleyi sero 2	35849	691-WI-H	238bp/342bp	Z30455	55
L. israelensis	43119	Bercovier-4	217bp/321bp	Z30583	56
L. jordanis	33623	BL-540	244bp/348bp	Z30539	57
L. longbeachae sero 1	33462	Long Beach-4	208bp/312bp	Z30456	58
L. longbeachae sero 2	33484	Tucker-1	208bp/312bp	Z30465	59
L. maceachernii	35300	PX-1-G2-E2	250bp/352bp	Z30461	60
L. micdadei	33218	Tatlock	267bp/371bp	Z30460	61
L. moravica	n.a.	316-36	236bp/340bp	Z30457	62
L. oakridgensis	33761	OR-10	197bp/302bp	Z30540	63
L. rubrilucens	35304	WA-270A-C2	219bp/324bp	Z30458	64
L. sainthelensi	35248	Mt St Helens-4	212bp/316bp	Z30459	65
L. spiritensis	35249	Mt St Helens-9	246bp/350bp	Z30464	66
L. steigerwaltii	35302	SC-18-C9	256bp/360bp	Z30463	67
L. wadsworthii	33877	81-716A	262bp/366bp	Z30462	68

Unter speziesspezifischen Nukleinsäuresonden werden Nukleinsäuren verstanden, die mit allen Serovaren einer Legionellaspesies unter denselben Stringenzbedingungen hybridisieren. Solche Sonden sind mit ihrer Sequenz in Beispiel 3 wiedergegeben. Darunter befindet sich auch eine L. pneumophila-Speziessonde, die mit allen Serovaren der Spezies pneumophila, nicht jedoch mit den übrigen, in Tabelle 1 genannten, Spezies aus der Gattung Legionella hybridisiert.

Die Nukleinsäuresonden der vorliegenden Erfindung sind mindestens 15 Basen lang, besonders bevorzugt zwischen 23 und 40 Basen. Es handelt sich somit um Nukleinsäuren, welche auf einfache Weise durch chemische Synthese in sogenannten (Nukleinsäure-) Synthesizern hergestellt werden können. Sequenzen, die als gattungsspezifische Sequenz für Legionella zu gebrauchen sind, erhält man durch Aussuchen einer mindestens 15 Basen langen Sequenz aus SEQ. ID.NO. 1, wobei eine Abweichung in 1 oder 2 Basen der Gattungsspezifität in Abhängigkeit von den Hybridisierungsbedingungen in den meisten Fällen keinen Abbruch tun wird. Es ist selbstverständlich, daß die Anzahl der Abweichungen mit zunehmender Größe der Nukleinsäuresonde zunehmen kann. Erfindungsgemäß sind daher Sonden bevorzugt, die zu mindestens 90 % homolog zu einem Teil der SEQ. ID. NO. 1 sind oder die zu mindestens 90 % komplementär zu einem Teil der SEQ. ID. NO. 1 sind. Besonders bevorzugt sind Sonden, welche eine mindestens 15 Basen lange Sequenz (in direkter Aufeinanderfolge) enthalten, die streng homolog oder streng komplementär zu einem Teil der SEQ. ID. NO. 1 ist.

Die Gattungsspezifität könnte leiden, wenn die Sonde weitere Legionellaspezies-spezifische Sequenzen oder nicht-Legionella spezifische Sequenzen enthält, die eine zu spezifische bzw. zu unspezifische Hybridisierung bewirken würden. Bevorzugt sind weitere Legionella-spezifischen Sequenzen, sofern sie überhaupt vorliegen, nicht mehr als 15 Basen lang.

Desweiteren kann eine Nukleinsäuresonde im Legionella-unspezifischen Teil funktionelle Nukleotidsequenzen, wie sie beispielsweise für Promotoren oder Origins of Replication charakteristisch sind, enthalten.

Innerhalb der SEQ. ID. NO. 1 sind bestimmte Bereiche zur Auswahl von gattungsspezifischen Sequenzen insbesondere für Nachweissonden besonders bevorzugt. Besonders bevorzugte Bereiche liegen zwischen den Positionen 94 und 126, 25 und 67, 336 und 293 sowie 307 und 286. Besonders bevorzugt schließt die Sequenz der Sonde die Sequenz von Position 268 bis 296 ein.

Das erfindungsgemäße Amplifikationsverfahren kommt im Gegensatz zum Stand der Technik mit weniger als 7 Primern aus. Dies ist beispielsweise möglich dadurch, daß als Primer eine oder mehrere der erfindungsgemäßen Nukleinsäuresonden benutzt werden. Ein Amplifikationsverfahren, welches mit nur einem Primer auskommt, wird schon dadurch realisiert, daß der Primer mit der zu amplifizierenden Nukleinsäure hybridisiert, mit Mononukleosidtriphosphaten unter Einwirkung einer DNS-Polymerase verlängert wird, das Verlängerungsprodukt von der Matrizennukleinsäure getrennt und der obige Vorgang mit einem neuen Primer wiederholt wird. In jedem Zyklus wird daher pro Nukleinsäure ein Verlängerungsprodukt gebildet. Es handelt sich somit um ein lineares Amplifikationsverfahren. Exponentielle Amplifikation ist theoretisch beispielsweise dann erreichbar, wenn 2 Primer eingesetzt werden, welche die prinzipiellen Bedingungen, wie sie in der EP-A-0 201 184 beschrieben sind, erfüllen. In einer vorteilhaften Ausführungsform wird ein weiteres Primerpaar eingesetzt, welches auf dem amplifizierten Nukleinsäurefragment zwischen den Hybridisierungspositionen des ersten Primerpaares hybridisiert. Diese Ausführungsform wird gelegentlich auch als "nested PCR" bezeichnet. Darin werden insgesamt 4 verschiedene Primer eingesetzt.

Auch bei den auf Transkriptionsreaktionen beruhenden Amplifikationsverfahren werden im allgemeinen Fall 2 Nukleinsäuresonden eingesetzt, die entweder auf gegenläufigen Strängen oder auf einem Strang der zu amplifizierenden Nukleinsäure hybridisiert werden können.

Erfindungsgemäß handelt es sich für das gattungsspezifische Amplifikationsverfahren bei allen als Primer fungierenden Nukleinsäuresonden um Legionella-gattungsspezifische Sonden. In einem besonders bevorzugten Fall hybridisiert einer der Primer mit einem Strang der Legionella-Nukleinsäure in der 23S-rDNS-Region und der andere mit dem Gegenstrang in der 5S-rDNS-Region. Dadurch wird erreicht, daß das amplifizierte Teilstück der Nukleinsäuresequenz der Legionellen sowohl Teile der 23S-rDNS-Region, der 5S-rDNS-Region als auch der dazwischenliegenden Spacerregion umfaßt. Zum Verständnis muß an dieser Stelle darauf hingewiesen werden, daß sich die Amplifikate unterschiedlicher Spezies in der Sequenz unterscheiden, der zwischen den einander zugewandten Enden der ursprünglichen Primer liegt. Dabei handelt es sich eben bevorzugt um Sequenzen der Spacer-Region.

Das erfindungsgemäße gattungsspezifische Amplifikationsverfahren kann für mehrere Zwecke benutzt werden. In einer ersten Möglichkeit (z. B. im Sinne eines Screenings) kann die Summe aller in der Probe vorliegenden Spezies der Gattung Legionella nachgewiesen werden. Dies ist beispielsweise möglich, wenn die in der gattungsspezifischen Amplifikation erzeugten Amplifikate mit einer weiteren gattungsspezifischen (gewünschtenfalls nachweisbar markierten) Nukleinsäuresonde zur Hybridisierung gebracht und die gebildeten Hybride nachgewiesen werden. Dabei kann die Nukleinsäuresonde (Nachweissonde) so gewählt werden, daß sie in den Bereichen nahe den ursprünglichen Primerhybridisierungsstellen hybridisiert, jedoch wird die Aussagekraft des gattungsspezifischen Nachweises dadurch noch erhöht, daß die Nukleinsäuresonde in dem zwischen den aufeinander zu zeigenden Enden der Primer liegenden Bereich der Amplifikate hybridisiert. Besonders bevorzugt hybridisiert die gattungsspezifische Nachweissonde zwischen den Positionen 242 und 299 von SEQ. ID. NO. 1 und ist zwischen 25 und 35 Nukleotiden, besonders bevorzugt 26 bis 30 Nukleotiden lang. Mit der Veränderung der Länge der Sonde muß die Hybridisierungstemperatur entsprechend angepaßt werden. Die optimale gattungsspezifische Sonde hybridisiert zwischen den Positionen 268 und 296 und ist somit 29 Nukleotide lang.

Prinzipiell sind für den Nachweis der Amplifikate alle bekannten Nachweisformate verwendbar, beispielsweise Auftrennung nach Größe der Amplifikate (z. B. Gelelektrophorese) aber auch die Blot-Verfahren. Beispielsweise kann

schon aufgrund der Größenvariabilitäten der Spacer-Region eine Differenzierung von Non-Pneumophila-Spezies im einfachen, hochauflösenden Agarosegel durchgeführt werden, was im Sinne eines Screeningverfahrens eine rasche orientierende Information liefert. Auf einen Nachweis, der auf einem Hybridisierungsschritt mit einer Nachweissonde beruht, kann jedoch meist nicht verzichtet werden. Als besonders vorteilhaft hat sich die Verwendung des Reverse-Dot-Blot-Formats erwiesen. Hierzu wird beispielsweise eine gattungsspezifische Nukleinsäuresonde auf einer Membran immobilisiert und anschließend das Produkt der Amplifikationsreaktion auf die immobilisierten Sonden gegeben. Dazu müssen die Amplifikate gegebenenfalls vorher einzelsträngig gemacht werden. Wenn während der Amplifikation markierte Mononukleosidtriphosphate eingebaut wurden, ist der Nachweis der über die Nukleinsäuresonde immobilisierten Amplifikate nach Abwaschen nicht gebundener Nukleinsäuren auf einfache Weise möglich. Ein solches Format ist beispielsweise in der EP-A-0 237 362 beschrieben. Auf den Inhalt dieser Patentanmeldung wird hiermit vollinhaltlich Bezug genommen.

Ein Nachweis ist jedoch auch über die sogenannten Sandwich-Verfahren möglich, bei denen neben der immobilisierten Nukleinsäuresonde eine weitere, markierte gattungsspezifische Nukleinsäuresonde (Nachweissonde) eingesetzt wird, die mit den Amplifikaten an einer anderen Position hybridisiert als die Festphasen-gebundene Sonde. Dieses Verfahren ist prinzipiell in EP-B-0 079 139 beschrieben.

Das erfindungsgemäße gattungsspezifische Amplifikationsverfahren ermöglicht jedoch auch den verlässlichen und unkomplizierten Nachweis von Legionella-Spezies (z. B. für den klinischen Routinealltag) oder Gemischen von Spezies (z. B. eine Unterscheidung von L-pneumophila von non-pneumophila). Für diesen Fall kann im Anschluß an das gattungsspezifische Amplifikationsverfahren eine Hybridisierung mit einer (gewünschtenfalls markierten) speziesspezifischen Sonde (Nachweissonde) durchgeführt werden, die im amplifizierten Bereich zwischen den aufeinander zu zeigenden Enden der Primer hybridisiert. In SEQ. ID-Nos. 26 - 68 sind Sequenzen, aus welchen die speziesspezifischen Sequenzen ausgewählt werden können, für einzelne Spezies angegeben. Die speziesspezifischen Teile befinden sich insbesondere im Spacer-Bereich, der bevorzugt mittels der gattungsspezifischen Primer amplifiziert wird. Die Lage der Amplifikate (z. B. wie in Tabelle 1 angegeben) ergibt sich aus den Hybridisierungspositionen der Primer (in Tabelle 1 ist dies das Primerpaar B/D). Besonders bevorzugte speziesspezifische Nachweissonden sind in Beispiel 3.7 angegeben.

Speziesspezifische Nachweissonden, die auf diesen Spacersequenzen beruhen, sind bevorzugt länger als 15 bp und kleiner als die gesamte Spacerregion.

Das erfindungsgemäße Verfahren ermöglicht daher den multiplen Nachweis von Legionella-Spezies unter Verwendung einer einzigen in einer vorgeschalteten gattungsspezifischen Amplifikationsreaktion hergestellten Reaktionsmischung, die Amplifikate von Teilen der in der Probe anwesenden Legionella-Spezies enthält. Ein Vorteil der Erfindung ist daher, daß sie einen einfacheren, d. h. weniger komplexen Nachweis von Bakterien der Gattung Legionella ermöglicht.

Ebenfalls Gegenstand der Erfindung ist daher ein Paar von Primern zur Amplifikation von Legionella-Nukleinsäuren, von denen einer mit einem Strang der 23S-Region und der andere mit dem Gegenstrang in der 5S-Region des Legionella-Genoms hybridisiert.

Ebenfalls Gegenstand der Erfindung ist eine doppelsträngige Legionella-spezifische Nukleinsäure, enthaltend die Spacerregion zwischen 5S-rDNS und 23S-rDNS sowie jeweils nur solche Teile der 5S-rDNS und 23S-rDNS, die im Genom direkt an die Spacerregion anschließen. Bevorzugt ist diese doppelsträngige Nukleinsäure höchstens 371 bp lang und ist das Produkt einer gattungsspezifischen Amplifikationsreaktion.

Ebenfalls Gegenstand der Erfindung ist ein Reagenzkit zum Nachweis von Legionella-Spezies enthaltend mindestens eine Legionella-gattungsspezifische Nukleinsäure und mindestens eine Legionella-speziesspezifische Sonde.

Die folgenden Beispiele sollen die Erfindung näher erläutern:

#### Beispiel 1:

##### **Bakteriengewinnung und Anzucht**

Die hier verwendeten Legionellen "Type strains" wurden auf gepuffertem Hefe-Kohle-Extraktagar (P.H. Edelstein, Laboratory Diagnosis of infections caused by legionellae, Eur. J. Clin. Microbiol. Vol. 6, 1, 4-10 (1987)) unter Zusatz von  $\alpha$ -Ketoglutarat bei einer Inkubationstemperatur von 35°C in feuchter CO<sub>2</sub>-Atmosphäre für mindestens 3 Tage angezüchtet. Gram-Färbungen, Mikroskopie und Inkubation von Blut-Agar-Platten zeigten kein Wachstum anderer Bakterien. Die Legionellen wurden mit 3 ml bidestilliertem Wassers von den Platten geerntet und verdünnt, mit 12.000 g zentrifugiert, der Überstand verworfen und das Zellpellet in 500  $\mu$ l bidestilliertem Wasser resuspendiert. Logarithmische Verdünnungsreihen und Auszählen der Kolonien auf Agarplatten ergaben durchschnittlich 10<sup>10</sup> KBE/ml.

Beispiel 2:

**DNS-Aufschluß**

5 Je ein 250 µl-Aliquot der jeweiligen Bakterienkultur wurde zur Freisetzung der DNS alkalisch lysiert (PCR: Clinical diagnostics and research; Springer Verlag Berlin/Heidelberg 1992, S. 79-80), indem 250 µl einer 200 mM NaOH-Lösung hinzugefügt, mit 100 µl Mineralöl (Sigma) überschichtet und für 20 Minuten in einem auf 95°C vorgeheizten Thermomixer inkubiert wurden. Nach Schütteln und Zentrifugation wurden 32 µl Tris-HCl (pH 5,0) zur Neutralisierung hinzugefügt, erneut geschüttelt und zentrifugiert. Kontrollproben mit bidestilliertem Wasser wurden identisch behan-

10 delt, um mögliche Kontaminationen während der Probenaufbereitung zu erkennen.  
Die so gewonnenen Nukleinsäuren konnten in den Amplifikations- und Hybridisierungs-experimenten eingesetzt werden.

Beispiel 3:

15

**Nachweis von Legionellen (Gattung und Spezies)**

Der Nachweis von Legionellen geschah durch erfindungsgemäße gattungsspezifische Amplifikation unter Einbau von mit Digoxigenin markiertem dUTP. Die markierten Amplifikate wurden anschließend mittels der Reverse Dot-Blot-  
20 Technik (Kawasaki et al.: Genetic analysis using polymerase chain reaction - amplified DNS and immobilized oligonucleotide probes: reverse dot-blot typing; in: Methods in Enzymology, Band 218, 1993) nachgewiesen.

1. Sonden-Herstellung (Tailing-Reaktion)

Boehringer Mannheim Terminale Transferase Kit 220-582  
25 200 pmol Oligonukleotid  
20 µl 5 x Reaktionspuffer  
6 µl 25 mM CoCl<sub>2</sub> (Endkonzentration 1,5 mM)  
8 µl 10 mM dTTP (Gesamtmenge 80 nmol)  
2,4 µl Terminale Transferase (60 U)  
30 ddH<sub>2</sub>O ad 100 µl  
Gemisch eine Stunde bei 37°C inkubieren.

2. Polymerasenkettenreaktion (PCR) & Digoxigenin-Markierung der PCR-Produkte

PCR 25 µl Ansätze:  
35 3,75 µl dNTPs (1 mM Konz)  
1,25 µl Boehringer DIG DNS Labeling mixture  
2,5 µl Perkin-Elmer Puffer I  
je 0,75 µl Primer (Stammlösung 10 µM)  
1 µl Taq Polymerase (Perkin-Elmer) (verdünnt 1 : 10)  
40 H<sub>2</sub>O ad 24 µl  
1 µl DNS  
Thermoprofil (Primer B & D; Perkin-Elmer 9600-Thermocycler)  
95° - 3 Min.  
95° - 30 Sek., 54° - 25 Sek., 72° - 30 Sek.: 30 Zyklen  
45 72° - 5 Min.  
herabkühlen auf 6°

3. Vorbereitung der Membranen

Boehringer Mannheim positively charged Nylon membranes in dünne Streifen schneiden. Mit Bleistift beschriften  
50 und mit abgeschnittener 1 ml-Pipettenspitze Kreise in die Membran "stampfen". 1 µl (2 pmol) Sonde auftragen, 10 Minuten lufttrocknen, mit 120 ml kreuzlinken (Stratalinker®, Stratagene).  
Waschen der Membran (um nicht gebundene Sonde zu entfernen): (alle Streifen zusammen in einem 50 ml Falcon®-Röhrchen)  
Waschlösung: 5 x SSPE, 0,5 % SDS 30 Minuten bei 61°  
55 Mit bidest. H<sub>2</sub>O kurz waschen  
lufttrocknen, Streifen können nach diesem Schritt bei -20° aufbewahrt werden.



## EP 0 739 988 A1

### 4. Hybridisierung

Prähybridisierung - in einzelnen, numerierten Eppis (Eppendorf-Gefäß)

- 5      Lösung (je 300ml)    5 x SSPE  
                                 0,5 % SDS  
                                 0,5 % Dextransulfat

30 Min. bei 61°.

- 10      Hybridisierung

PCR-Produkt wird 10 Minuten bei 95° denaturiert und zügig nach Ende der Prähybridisierung zugegeben.  
Genau eine Stunde bei 61° bei sanfter Rotation hybridisieren lassen.

Nach Abschluß der Hybridisierung werden die Membranen (im selben Eppendorf-Gefäß, mit jeweils 300 µl der folgenden Lösung) gewaschen:

- 15      2 x SSPE

0,1 % SDS

Waschschritte (unter leichtem Schütteln): zweimal 5 Min. bei Raumtemperatur und einmal 10 Min. bei 65°.

### 5. Detektion

- 20      Alle Schritte werden unter ständigem leichtem Schütteln in einem 50 ml Falcon-Röhrchen durchgeführt (Puffervolumen ca. 30 ml) (Boehringer Mannheim Katalog Nr. 117504)

a) 30 Min. D1-Puffer

b) 30 Min. D2-Puffer

- 25      c) 3 µl Antikörper-Konjugatlösung mit 30 ml frischem D2-Puffer vermischen, 30 Min. inkubieren

d) 2 x 15 Min. D1-Puffer

e) kurze Inkubierung in D3-Puffer

f) Die Membranen werden mit der DNS-Seite nach oben in einer Klarsichthülle platziert:

45 µl NBT

- 30      35 µl X-Phosphat-Lösung

10 ml D3-Puffer

g) Die Farblösung zugeben, die Membranen dabei nicht bewegen. Genau 15 Min. entwickeln.

h) Stopplösung: D4-Puffer

i) lufttrocknen

35

40

45

50

55

## Puffer

5

10

15

20

25

30

35

20 x SSPE	3M NaCl	175,3 g NaCl
	0,2 M Na <sub>2</sub> H <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>	27,6g Na <sub>2</sub> H <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>
	20 mM EDTA	7,4g EDTA
	pH auf 7,4 mit NaOH einstellen, aqua bidest. ad 1.000 ml	
2 x SDS	20 g SDS	
	pH auf 7,2 mit HCl (ein paar Tropfen) einstellen, aqua bidest ad 1.000 ml	
D1	100 mM Maleinsäure	
	150 mM NaCl	
	0,3 % (w/v) Tween 20	
	pH auf 7,5 bei 20° mit NaOH einstellen	
D2	1,0 % Blocking-Reagens (Kasein, Boehringer Kit), gelöst in D1, muß ca. eine Stunde vor Gebrauch hergestellt werden bzw. kann bei -20° aufbewahrt werden.	
D3	100 mM TrisHCl	
	100 mM NaCl	
	50 mM MgCl <sub>2</sub>	
	pH auf 9,5 bei 20° einstellen	
D4	10 mM Tris HCl	
	1 mM EDTA	
	pH auf 8,0 einstellen	

35

## 6. PCR-Primer

18mer: 5'-GGCTGATTGTCTTGACCA-3' (Primer B)	SEQ.ID.No. 2
20mer: 5'-AGGAAGCCTCACACTATCAT-3' (Primer D)	SEQ.ID.No. 3
24mer: GTTGAAGACTACGACGTTGATAGG (Primer A)	SEQ.ID.No. 4
21 mer: AATGTTTCACTTCTGAGTTCG (Primer C)	SEQ.ID.No. 5

40

## 7. Oligonucleotidsonden (5S-rDNS):

## Gattungssonde:

29mer: 5'-AACCACTGATACCATCTCGAACTCAGAA-3'	SEQ.ID.No. 6
---	--------------

45

## L. pneumophila-Speziessonde:

31mer: 5'-ACGTGAAACGTATCGTGAACTCTGACTC-3'	SEQ.ID.No. 7
---	--------------

## L. anisa-Speziessonde:

36mer: 5'-ATGCGAATACAAGATGTAGGTTGGGC-3'	SEQ.ID.No. 8
---	--------------

50

## L. micdadei-Speziessonde:

34mer: 5'-ATGTAAATTGCTCAGACAAATGAATACAGAGTTT-3'	SEQ.ID.No. 9
---	--------------

## L. brunensis-Speziessonde:

31mer: 5'-CCTGTTTTTACAGAGCACTTAACAATGCTCT-3'	SEQ.ID.No. 10
--	---------------

## L. cherrii-Speziessonde:

29mer: 5'-AATGCAAATACAAGAAATTTAGGTTGGGC-3'	SEQ.ID.No. 11
--	---------------

55

## L. cincinnatiensis-Speziessonde:

27mer: 5'-CTCTCTTTTACCGGAAGTAACGCG-3'	SEQ.ID.No. 12
---------------------------------------	---------------

## L. dumoffii-Speziessonde:

26mer: 5'-ATCAATACCTGGGGTAGGACACCTGC-3'	SEQ.ID.No. 13
---	---------------

## L. erythra-Speziessonde:

# EP 0 739 988 A1

24mer: 5'-AACCCGGGTAAGACCGGAAAAACC-3' SEQ.ID.No. 14  
 L. feeleyi-Speziessonde:  
 27mer: 5'-GCAAAAATGAAAGACAAATGCGTTTGT-3' SEQ.ID.No. 15  
 L. israelensis-Speziessonde:  
 5 27mer: 5'-TTAAACGCTTGTGAATCAAACCCATTC-3' SEQ.ID.No. 16  
 L. jordanis-Speziessonde:  
 27mer: 5'-TGATGAATGAATATCCCCTAACATGGG-3' SEQ.ID.No. 17  
 L. longbeachae-Speziessonde:  
 39mer: 5'-TGCTTGATATAAGATATAATACCTCTTTATTACCTGAG-3' SEQ.ID.No. 18  
 10 L. maceachernii-Speziessonde:  
 32mer: 5'-GGCAATACCTTTAATTAAGGCATTAATGCCTA-3' SEQ.ID.No. 19  
 L. moravica-Speziessonde:  
 23mer: 5'-AGGCCTTGGGCTTGTGATTGAA-3' SEQ.ID.No. 20  
 L. sainthelensi-Speziessonde:  
 15 40mer: 5'-GTGCTGAATATAAGATATAATGTTACTCTCTTTATTACC-3' SEQ.ID.No. 21  
 L. spiritensis-Speziessonde:  
 25mer: 5'-GTGTGCCCTGAAGAAGAACAGGGT-3' SEQ.ID.No. 22  
 L. steigerwaltii-Speziessonde:  
 28mer: 5'-AATGTGTATACAAGCTGTAGGTTGGCCA-3' SEQ.ID.No. 23  
 20 L. wadsworthii-Speziessonde:  
 30mer: 5'-GTACGTACGAATTAGAGATTGGGTCTAGGC-3' SEQ.ID.No. 24

## 8. Nachweisverfahren

### a) Reverse dot-blot-Hybridisierung mit 4 verschiedenen Sonden

Gemäß obigem Arbeitsprotokoll wurden Nachweisverfahren unter Verwendung des gattungsspezifischen Amplifikationsverfahrens und einer gattungs- (A) bzw. 3-speziesspezifischen (B: *L. pneumophila*; C: *L. anisa*; D: *L. micdadei*) Sonden durchgeführt. In Figur 2 ist die Farbentwicklung an 10 Filtern gezeigt. Es ist klar erkenntlich, daß die genus-(gattungsspezifische) Sonde (A) in jedem Falle ein Nachweissignal liefert. Die *L. pneumophila*-spezifische Sonde (B) reagiert nur mit dem Filter, der auch den Serovar 1, Philadelphia von *L. pneumophila* enthält. Mit der *L. anisa*-spezifischen Sonde (C) ist im Filter Nr. 4 ein deutliches Signal sichtbar. Die Spezies *L. micdadei* ließ sich mit der *L. micdadei*-spezifischen Sonde (D) nachweisen. *L. gormanii* konnte mit der gattungsspezifischen Sonde nachgewiesen werden (Filter Nr. 9).

Die Belegung der Filter mit nachzuweisenden Nukleinsäuren war folgende:

- 1: *L. dumofii* (2pmol probe)
- 2: *L. anisa* (2pmol probe)
- 3: *L. anisa* (4pmol probe)
- 4: *L. anisa* (8pmol probe)
- 5: *L. micdadei* ATCC 33218 (2pmol probe)
- 6: *L. micdadei* ATCC 33218 (4pmol probe)
- 7: *L. micdadei* L 5443/90 (2pmol probe)
- 8: *L. micdadei* L 5443/90 (4pmol probe)
- 9: *L. gormanii*
- 10: *L. pneumophila* sero 1 Philadelphia

### Amplifikation der 23S-5S-Spacer Region von *Pneumophila* und non-*Pneumophila* Spezies

In Figur 3, 4 und 5 ist das Ergebnis der Amplifikation der 23S-5S-Spacer Region mit Hilfe der gattungsspezifischen Primer gemäß der vorliegenden Erfindung gezeigt. Es ist klar erkenntlich, daß in jedem Fall eine Amplifikation stattfindet, wobei sich in vielen Fällen die Größe der Amplifikate der einzelnen Spezies unterscheidet. Über die Größe der Amplifikate ist daher eine Unterscheidung der Spezies von *Legionella* nach gattungsspezifischer Amplifikation möglich.

- 1: *L. pneumophila* sero 12 570-CO-H (FIG 3)
- 2: *L. pneumophila* sero 13
- 3: *L. pneumophila* sero 14 1169-MN-H
- 4: *L. anisa* WA-316-C3
- 5: *L. brunensis*
- 6: *L. cherii* ORW

- 7: *L. cincinattensis* 72-OH-H  
 8: *L. dumofii* NY-23  
 9: *L. erythra* SE-32A-C8  
 10: *L. feeleeii* sero 1 WO-44C  
 11: *L. feeleeii* sero 2 691-WI-H  
 12: *L. israelensis* Bercovier-4  
 M: 100bp DNA size marker  
 1: *L. jordanis* BL-540 (FIG 4)  
 2: *L. longeachae* sero 1 Long Beach-4  
 3: *L. longbeachae* sero 2 Tucker-1  
 4: *L. maceachernii* PX-1-G2-E2  
 5: *L. micdadei* TATLOCK  
 6: *L. moravica* 316-36  
 7: *L. oakridgensis* OR-10  
 8: *L. rubrilucens* WA-270-C2  
 9: *L. sainthelensi* Mt. St. Helens-4  
 10: *L. spiritensis* Mt. St. Helens-9  
 11: *L. steigerwaltii* SC-18-C9  
 12: *L. wadsworthii* 81-716A  
 M: 100bp DNA size marker  
 1: negative control (FIG 5)  
 2: *L. pneumophila* sero 1 Philadelphia 1  
 3: *L. pneumophila* sero 2 Togu-1  
 4: *L. pneumophila* sero 3 Bloomington-2  
 5: *L. pneumophila* sero 4 Los Angeles-1  
 6: *L. pneumophila* sero 5 Dallas-1E  
 7: *L. pneumophila* sero 6 Chicago-2  
 8: *L. pneumophila* sero 7 Chicago-8  
 9: *L. pneumophila* sero 8 Concord-3  
 10: *L. pneumophila* sero 9 IN-23-G1-C2  
 11: *L. pneumophila* sero 19 Leiden-1  
 12: *L. pneumophila* sero 11 797-PA-H  
 M: 100bp DNA size marker

Anstelle der in Beispiel 3 verwendeten Primer B und D können auch Primer eingesetzt werden, deren Hybridisierungspositionen auf SEQ. ID. NO. 1 abweichen. Im Folgenden sind konkrete Hybridisierungspositionen (erste Basenpaarung und Länge) von weiteren Primern angegeben. Auch bezüglich der gattungsspezifischen Sonde sind im Folgenden gleichfalls geeignete Sonden angegeben. Ebenfalls im Folgenden angegeben ist, welche Kombinationen der Primer für eine gattungsspezifische Amplifikation besonders geeignet sind.

#### Beispiel 4:

#### **Variationsmöglichkeiten der Primer und Sonden**

##### Primer

##### **Primer B - Variationsmöglichkeiten**

- 1) Pos. 104, 18mer,  $T_m$  43,9° (Primer B aus Beispiel 3)  
 2) Pos. 105, 21mer,  $T_m$  43,0°  
 3) Pos. 110, 22mer,  $T_m$  42,8°  
 4) Pos. 103, 18mer,  $T_m$  43,9°  
 5) Pos. 101, 19mer,  $T_m$  42,7°  
 6) Pos. 100, 19mer,  $T_m$  43,5°  
 7) Pos. 99, 20mer,  $T_m$  44,2°  
 8) Pos. 100, 20mer,  $T_m$  45,0°  
 9) Pos. 98, 20mer,  $T_m$  43,5°  
 10) Pos. 94, 21mer,  $T_m$  43,1°

# EP 0 739 988 A1

- 11) Pos. 104, 19mer,  $T_m$  45,2°  
 12) Pos. 105, 23mer,  $T_m$  46,1°  
 13) Pos. 113, 23mer,  $T_m$  44,7°  
 14) Pos. 102, 19mer,  $T_m$  46,3°  
 5 15) Pos. 100, 20mer,  $T_m$  45,0°  
 16) Pos. 99, 21mer,  $T_m$  45,6°  
 17) Pos. 98, 21mer,  $T_m$  45,8°  
 18) Pos. 96, 22mer,  $T_m$  45,5°  
 19) Pos. 105, 22mer,  $T_m$  45,1°  
 10 20) Pos. 109, 23mer,  $T_m$  44,0°

## Primer D - Variationsmöglichkeiten

- 21) Pos. 316, 20mer,  $T_m$  43,7° (Primer D aus Beispiel 3)  
 15 22) Pos. 312, 19mer,  $T_m$  46,0°  
 23) Pos. 317, 20mer,  $T_m$  44,9°

## Primer A:

- 20 1) Pos. 34, 21mer,  $T_m$  44,5°  
 2) Pos. 35, 22mer,  $T_m$  45,4°  
 3) Pos. 37, 21mer,  $T_m$  44,5°  
 4) Pos. 39, 20mer,  $T_m$  44,6°  
 5) Pos. 38, 29mer,  $T_m$  42,1°  
 25 6) Pos. 31, 18mer,  $T_m$  43,1°  
 7) Pos. 29, 18mer,  $T_m$  45,9°  
 8) Pos. 27, 18mer,  $T_m$  43,2°  
 9) Pos. 25, 18mer,  $T_m$  45,4°  
 10) Pos. 41, 19mer,  $T_m$  43,8°  
 30

## Primer C:

- 11) Pos. 286, 21mer,  $T_m$  44,7°  
 12) Pos. 286, 20mer,  $T_m$  42,4°  
 35 Variationsmöglichkeiten der 5S-Gattungssonde (nur für Primerkombination B/D)

- Pos. 268, 29mer,  $T_m$  61,0° (in Beispiel 3 verwendete Sonde)  
 Pos. 269, 29mer,  $T_m$  60,7°  
 Pos. 270, 29mer,  $T_m$  60,7°  
 40 Pos. 271, 30mer,  $T_m$  61,5°  
 Pos. 267, 29mer,  $T_m$  61,4°  
 Pos. 265, 27mer,  $T_m$  60,6°

- 23S Gattungssonde (nur für Primerkombination A/C geeignet)  
 45 5'-TTGTAGTAATTGGCTGATTGTCTTGACCATA-3' SEQ.ID.No. 25

Variationsmöglichkeiten der L-pneumophila Speziessonde (nur für Primerkombination B/D und A/C geeignet)

- Pos. 162, 39mer,  $T_m$  59,1° (in Beispiel 3 verwendete Sonde)  
 50 Pos. 160, 32mer,  $T_m$  59,3°  
 Pos. 163, 31mer,  $T_m$  60,1°  
 Pos. 159, 33mer,  $T_m$  59,4°

- Die Positionsangaben (5'-terminale Base) beziehen sich auf die in FIG 1 abgebildete Sequenz, wobei Primer B und  
 55 A komplementär zu den Teilen der Sequenz von FIG 1 sind, die bei der jeweiligen Position beginnen, und Primer D und  
 C sequenzidentisch zu den Teilen der Sequenz von FIG 1 sind, die bei der jeweiligen Position beginnen und sich strom-  
 abwärts (von der Sequenz in FIG 1 aus gesehen) fortsetzen.

# EP 0 739 988 A1

	Primerkombinationen	
	Primer B/D	Primer A/C
5	1/21	1/11
	2/21	2/11
	3/21	3/11
10	5/21	4/11
	6/21	5/12
	7/21	6/12
15	9/21	7/11
	10/21	8/12
	11/22	9/11
	12/22	10/11
20	13/22	
	14/22	
	15/22	
25	16/22	
	17/22	
	18/22	
30	11/23	
	4/23	
	19/23	
	20/23	
35	8/23	
	17/23	

40 Alle angegebenen Primer und Nukleotidsequenzen sind DNS (Oligonukleotide im Falle der Primer und Sonden) linear, einzelsträngig.

Bevorzugt sind die erfindungsgemäßen Sonden spezifisch für *Legionella*, d. h., sie besitzen keine Wirkung als Primer bzw. Nachweissonden für Organismen, die nicht zur Gattung *Legionella* gehören. Die Primerpaare B/D und A/C wurden als nicht wirksam gegenüber *Bacillus cereus*, *Branhamella catharrhalis*, *Candida albicans*, *Chlamydia trachomatis*, *Corynebacterium diphtheriae*, *Cryptococcus*, *Escherichia coli*, *Haemophilus influenzae*, *Lactobacterium*, *Listeria monocytogenes*, *Mycobacterium africanum*, *avium*, *bovis*, *flavescens*, *fortuitum*, *gordanae*, *kansasii*, *terrae* and *xenopis*, *Neisseria meningitidis*, *Nocardia*, *Proteus vulgaris*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Rhodococcus*, *Salmonella enteritidis*, *Staphylococcus aureus*, *Streptococcus faecalis*, *milleri*, *pneumoniae* and *viridans* and  $\beta$ -hemolytic *Streptococcus pyogenes*, *Trichomonas vaginalis* and *Vibrio cholerae* charakterisiert.

SEQUENZPROTOKOLL

5

(1) ALLGEMEINE ANGABEN:

(i) ANMELDER:

10

(A) NAME: Boehringer Mannheim GmbH

(B) STRASSE: Sandhoferstr.116

(C) ORT: Mannheim

(E) LAND: DE

15

(F) POSTLEITZAHL: 68305

(G) TELEFON: 0621 759 4348

(H) TELEFAX: 0621 759 4457

(ii) BEZEICHNUNG DER ERFINDUNG: Gattungs- und speziesspezifische  
Identifizierung von Legionellen

20

(iii) ANZAHL DER SEQUENZEN: 68

(iv) COMPUTER-LESBARE FASSUNG:

25

(A) DATENTRÄGER: Floppy disk

(B) COMPUTER: IBM PC compatible

(C) BETRIEBSSYSTEM: PC-DOS/MS-DOS

(D) SOFTWARE: PatentIn Release #1.0, Version #1.30 (EPA)

30

(2) ANGABEN ZU SEQ ID NO: 1:

(i) SEQUENZKENNZEICHEN:

(A) LÄNGE: 336 Basenpaare

35

(B) ART: Nucleotid

(C) STRANGFORM: Einzelstrang

(D) TOPOLOGIE: linear

(ii) ART DES MOLEKÜLS: Sonstige Nucleinsäure

40

(A) BESCHREIBUNG: /desc = "Konsensussequenz"

(vi) URSPRÜNGLICHE HERKUNFT:

(A) ORGANISMUS: Legionella

45

(xi) SEQUENZBESCHREIBUNG: SEQ ID NO: 1:

GCCTCCCTCA AGATGAGTTT TCCCATGAAG CCCGTTGAAG ACTACGACGT TGATAGGCAA	60
GGTGTGGAAG CGCAGTAATG CGTGAAGCTA ACTTGTACTA ATTGGCTGAT TGTCTTGACC	120
ATATAATCTG AGTGACTTCA GAATGTGATA TTGATTTGTA TACGTCAAAC GTATCGTGTA	180
AACTCTGACT CTTTACCAA CCTGTGGCTT AATATAGCAA TCAAAGCCTC AGGTAAACCA	240

55

# EP 0 739 988 A1

GTTCCTCTGG CGACTATAGC GATTGGAAC CACCTGATAC CATCTCGAAC TCAGAAGTGA 300  
AACATTTCGG CGCCAATGAT AGTGTGAGGC TTCCTC 336

5

(2) ANGABEN ZU SEQ ID NO: 2:

(i) SEQUENZKENNZEICHEN:

(A) LÄNGE: 18 Basenpaare

10

(B) ART: Nucleotid

(C) STRANGFORM: Einzelstrang

(D) TOPOLOGIE: linear

(ii) ART DES MOLEKÜLS: Sonstige Nucleinsäure

15

(A) BESCHREIBUNG: /desc = "DNA-Oligonucleotide"

(iii) HYPOTHETISCH: NEIN

(iv) ANTISENSE: JA

(vi) URSPRÜNGLICHE HERKUNFT:

20

(A) ORGANISMUS: Legionella

(xi) SEQUENZBESCHREIBUNG: SEQ ID NO: 2:

25

GGCTGATTGT CTTGACCA

18

(2) ANGABEN ZU SEQ ID NO: 3:

(i) SEQUENZKENNZEICHEN:

30

(A) LÄNGE: 20 Basenpaare

(B) ART: Nucleotid

(C) STRANGFORM: Einzelstrang

(D) TOPOLOGIE: linear

35

(ii) ART DES MOLEKÜLS: Sonstige Nucleinsäure

(A) BESCHREIBUNG: /desc = "DNA-Oligonucleotide"

(iii) HYPOTHETISCH: NEIN

(iv) ANTISENSE: JA

40

(vi) URSPRÜNGLICHE HERKUNFT:

(A) ORGANISMUS: Legionella

(xi) SEQUENZBESCHREIBUNG: SEQ ID NO: 3:

45

AGGAAGCCTC AACTATCAT

20

(2) ANGABEN ZU SEQ ID NO: 4:

50

(i) SEQUENZKENNZEICHEN:

(A) LÄNGE: 24 Basenpaare

55



EP 0 739 988 A1

5 (B) ART: Nucleotid  
(C) STRANGFORM: Einzelstrang  
(D) TOPOLOGIE: linear  
(ii) ART DES MOLEKÜLS: Sonstige Nucleinsäure  
(A) BESCHREIBUNG: /desc = "DNA-Oligonucleotide"  
10 (iii) HYPOTHETISCH: NEIN  
(iv) ANTISENSE: JA  
(vi) URSPRÜNGLICHE HERKUNFT:  
(A) ORGANISMUS: Legionella  
15 (xi) SEQUENZBESCHREIBUNG: SEQ ID NO: 4:

GTGAAGACT ACGACGTTGA TAGG

24

20 (2) ANGABEN ZU SEQ ID NO: 5:  
(i) SEQUENZKENNZEICHEN:  
(A) LÄNGE: 21 Basenpaare  
(B) ART: Nucleotid  
25 (C) STRANGFORM: Einzelstrang  
(D) TOPOLOGIE: linear  
(ii) ART DES MOLEKÜLS: Sonstige Nucleinsäure  
(A) BESCHREIBUNG: /desc = "DNA-Oligonucleotide"  
30 (iii) HYPOTHETISCH: NEIN  
(iv) ANTISENSE: JA  
(vi) URSPRÜNGLICHE HERKUNFT:  
(A) ORGANISMUS: Legionella  
35 (xi) SEQUENZBESCHREIBUNG: SEQ ID NO: 5:

AATGTTTCAC TTCTGAGTTC G

21

40 (2) ANGABEN ZU SEQ ID NO: 6:  
(i) SEQUENZKENNZEICHEN:  
(A) LÄNGE: 29 Basenpaare  
45 (B) ART: Nucleotid  
(C) STRANGFORM: Einzelstrang  
(D) TOPOLOGIE: linear  
(ii) ART DES MOLEKÜLS: Sonstige Nucleinsäure  
50 (A) BESCHREIBUNG: /desc = "DNA-Oligonucleotide"  
(iii) HYPOTHETISCH: NEIN  
(iv) ANTISENSE: JA  
55

EP 0 739 988 A1

(vi) URSPRÜNGLICHE HERKUNFT:

(A) ORGANISMUS: Legionella

(xi) SEQUENZBESCHREIBUNG: SEQ ID NO: 6:

AACCACCTGA TACCATCTCG AACTCAGAA

29

(2) ANGABEN ZU SEQ ID NO: 7:

(i) SEQUENZKENNZEICHEN:

(A) LÄNGE: 30 Basenpaare

(B) ART: Nucleotid

(C) STRANGFORM: Einzelstrang

(D) TOPOLOGIE: linear

(ii) ART DES MOLEKÜLS: Sonstige Nucleinsäure

(A) BESCHREIBUNG: /desc = "DNA-Oligonucleotide"

(iii) HYPOTHETISCH: NEIN

(iv) ANTISENSE: JA

(vi) URSPRÜNGLICHE HERKUNFT:

(A) ORGANISMUS: Legionella pneumophila

(xi) SEQUENZBESCHREIBUNG: SEQ ID NO: 7:

ACGTGAAACG TATCGTGTA ACTCTGACTC

30

(2) ANGABEN ZU SEQ ID NO: 8:

(i) SEQUENZKENNZEICHEN:

(A) LÄNGE: 26 Basenpaare

(B) ART: Nucleotid

(C) STRANGFORM: Einzelstrang

(D) TOPOLOGIE: linear

(ii) ART DES MOLEKÜLS: Sonstige Nucleinsäure

(A) BESCHREIBUNG: /desc = "DNA-Oligonucleotide"

(iii) HYPOTHETISCH: NEIN

(iv) ANTISENSE: JA

(vi) URSPRÜNGLICHE HERKUNFT:

(A) ORGANISMUS: Legionella anisa

(xi) SEQUENZBESCHREIBUNG: SEQ ID NO: 8:

ATGCCAATAC AAGATGTAGG TTGGGC

26

# EP 0 739 988 A1

## (2) ANGABEN ZU SEQ ID NO: 9:

### (i) SEQUENZKENNZEICHEN:

- (A) LÄNGE: 34 Basenpaare
- (B) ART: Nucleotid
- (C) STRANGFORM: Einzelstrang
- (D) TOPOLOGIE: linear

### (ii) ART DES MOLEKÜLS: Sonstige Nucleinsäure

- (A) BESCHREIBUNG: /desc = "DNA-Oligonucleotide"

### (iii) HYPOTHETISCH: NEIN

### (iv) ANTISENSE: JA

### (vi) URSPRÜNGLICHE HERKUNFT:

- (A) ORGANISMUS: Legionella micdadei

### (xi) SEQUENZBESCHREIBUNG: SEQ ID NO: 9:

ATGTAAATTG CTCAGACAAA TGAATACAGA GTTT

34

## (2) ANGABEN ZU SEQ ID NO: 10:

### (i) SEQUENZKENNZEICHEN:

- (A) LÄNGE: 31 Basenpaare
- (B) ART: Nucleotid
- (C) STRANGFORM: Einzelstrang
- (D) TOPOLOGIE: linear

### (ii) ART DES MOLEKÜLS: Sonstige Nucleinsäure

- (A) BESCHREIBUNG: /desc = "DNA-Oligonucleotide"

### (iii) HYPOTHETISCH: NEIN

### (iv) ANTISENSE: JA

### (vi) URSPRÜNGLICHE HERKUNFT:

- (A) ORGANISMUS: Legionella brunensis

### (xi) SEQUENZBESCHREIBUNG: SEQ ID NO: 10:

CCTGTTTTTA CAGAGCACTT AACAAATGCTC T

31

## (2) ANGABEN ZU SEQ ID NO: 11:

### (i) SEQUENZKENNZEICHEN:

- (A) LÄNGE: 29 Basenpaare
- (B) ART: Nucleotid
- (C) STRANGFORM: Einzelstrang
- (D) TOPOLOGIE: linear

EP 0 739 988 A1

- (ii) ART DES MOLEKÜLS: Sonstige Nucleinsäure  
(A) BESCHREIBUNG: /desc = "DNA-Oligonucleotide"  
(iii) HYPOTHETISCH: NEIN  
(iv) ANTISENSE: JA  
(vi) URSPRÜNGLICHE HERKUNFT:  
(A) ORGANISMUS: Legionella cherrii  
(xi) SEQUENZBESCHREIBUNG: SEQ ID NO: 11:

AATGCAAATA CAAGAAATT AGGTTGGGC

29

- (2) ANGABEN ZU SEQ ID NO: 12:  
(i) SEQUENZKENNZEICHEN:  
(A) LÄNGE: 27 Basenpaare  
(B) ART: Nucleotid  
(C) STRANGFORM: Einzelstrang  
(D) TOPOLOGIE: linear  
(ii) ART DES MOLEKÜLS: Sonstige Nucleinsäure  
(A) BESCHREIBUNG: /desc = "DNA-Oligonucleotide"  
(iii) HYPOTHETISCH: NEIN  
(iv) ANTISENSE: JA  
(vi) URSPRÜNGLICHE HERKUNFT:  
(A) ORGANISMUS: Legionella cincinnatensis  
(xi) SEQUENZBESCHREIBUNG: SEQ ID NO: 12:

CTCTCTTTT TTACCGGAAG TAACGCG

27

- (2) ANGABEN ZU SEQ ID NO: 13:  
(i) SEQUENZKENNZEICHEN:  
(A) LÄNGE: 26 Basenpaare  
(B) ART: Nucleotid  
(C) STRANGFORM: Einzelstrang  
(D) TOPOLOGIE: linear  
(ii) ART DES MOLEKÜLS: Sonstige Nucleinsäure  
(A) BESCHREIBUNG: /desc = "DNA-Oligonucleotide"  
(iii) HYPOTHETISCH: NEIN  
(iv) ANTISENSE: JA  
(vi) URSPRÜNGLICHE HERKUNFT:  
(A) ORGANISMUS: Legionella dumoffii  
(xi) SEQUENZBESCHREIBUNG: SEQ ID NO: 13:

ATCAATACCT GGGGTAGGAC ACCTGC

26

- 5 (2) ANGABEN ZU SEQ ID NO: 14:
- (i) SEQUENZKENNZEICHEN:
    - (A) LÄNGE: 24 Basenpaare
    - (B) ART: Nucleotid
    - 10 (C) STRANGFORM: Einzelstrang
    - (D) TOPOLOGIE: linear
  - (ii) ART DES MOLEKÜLS: Sonstige Nucleinsäure
  - 15 (A) BESCHREIBUNG: /desc = "DNA-Oligonucleotide"
  - (iii) HYPOTHETISCH: NEIN
  - (iv) ANTISENSE: JA
  - (v) URSPRÜNGLICHE HERKUNFT:
    - 20 (A) ORGANISMUS: Legionella erythra
  - (xi) SEQUENZBESCHREIBUNG: SEQ ID NO: 14:

AACCCGGGTA AGACCGGAAA AACC

24

- 25 (2) ANGABEN ZU SEQ ID NO: 15:
- (i) SEQUENZKENNZEICHEN:
    - (A) LÄNGE: 27 Basenpaare
    - 30 (B) ART: Nucleotid
    - (C) STRANGFORM: Einzelstrang
    - (D) TOPOLOGIE: linear
  - (ii) ART DES MOLEKÜLS: Sonstige Nucleinsäure
  - 35 (A) BESCHREIBUNG: /desc = "DNA-Oligonucleotide"
  - (iii) HYPOTHETISCH: NEIN
  - (iv) ANTISENSE: JA
  - 40 (v) URSPRÜNGLICHE HERKUNFT:
    - (A) ORGANISMUS: Legionella feeleeii
  - (xi) SEQUENZBESCHREIBUNG: SEQ ID NO: 15:

GCAAAAATGA AAGACAAATG CGTTGT

27

- 45 (2) ANGABEN ZU SEQ ID NO: 16:
- (i) SEQUENZKENNZEICHEN:
    - 50 (A) LÄNGE: 27 Basenpaare
    - (B) ART: Nucleotid

55

EP 0 739 988 A1

(C) STRANGFORM: Einzelstrang  
(D) TOPOLOGIE: linear  
5 (ii) ART DES MOLEKÜLS: Sonstige Nucleinsäure  
(A) BESCHREIBUNG: /desc = "DNA-Oligonucleotide"  
(iii) HYPOTHETISCH: NEIN  
(iv) ANTISENSE: JA  
10 (vi) URSPRÜNGLICHE HERKUNFT:  
(A) ORGANISMUS: Legionella israelensis  
(xi) SEQUENZBESCHREIBUNG: SEQ ID NO: 16:  
15 TTAAACGCTT GTGAATCAAA CCCATTC 27  
(2) ANGABEN ZU SEQ ID NO: 17:  
20 (i) SEQUENZKENNZEICHEN:  
(A) LÄNGE: 27 Basenpaare  
(B) ART: Nucleotid  
(C) STRANGFORM: Einzelstrang  
25 (D) TOPOLOGIE: linear  
(ii) ART DES MOLEKÜLS: Sonstige Nucleinsäure  
(A) BESCHREIBUNG: /desc = "DNA-Oligonucleotide"  
(iii) HYPOTHETISCH: NEIN  
30 (iv) ANTISENSE: JA  
(vi) URSPRÜNGLICHE HERKUNFT:  
(A) ORGANISMUS: Legionella jordanis  
35 (xi) SEQUENZBESCHREIBUNG: SEQ ID NO: 17:  
TGATGAATGA ATATCCCCTA ACATGGG 27  
(2) ANGABEN ZU SEQ ID NO: 18:  
(i) SEQUENZKENNZEICHEN:  
(A) LÄNGE: 39 Basenpaare  
(B) ART: Nucleotid  
45 (C) STRANGFORM: Einzelstrang  
(D) TOPOLOGIE: linear  
(ii) ART DES MOLEKÜLS: Sonstige Nucleinsäure  
(A) BESCHREIBUNG: /desc = "DNA-Oligonucleotide"  
50 (iii) HYPOTHETISCH: NEIN  
(iv) ANTISENSE: JA  
55

EP 0 739 988 A1

(vi) URSPRÜNGLICHE HERKUNFT:

(A) ORGANISMUS: *Legionella longbeachae*

(xi) SEQUENZBESCHREIBUNG: SEQ ID NO: 18:

TGCTTGATAT AAGATATAAT ACCTCTTTAT TTACCTGAG

39

(2) ANGABEN ZU SEQ ID NO: 19:

(i) SEQUENZKENNZEICHEN:

(A) LÄNGE: 32 Basenpaare

(B) ART: Nucleotid

(C) STRANGFORM: Einzelstrang

(D) TOPOLOGIE: linear

(ii) ART DES MOLEKÜLS: Sonstige Nucleinsäure

(A) BESCHREIBUNG: /desc = "DNA-Oligonucleotide"

(iii) HYPOTHETISCH: NEIN

(iv) ANTISENSE: JA

(vi) URSPRÜNGLICHE HERKUNFT:

(A) ORGANISMUS: *Legionella maceachernii*

(xi) SEQUENZBESCHREIBUNG: SEQ ID NO: 19:

GGCAATACTT TAATTAAAGG CATTAATGCC TA

32

(2) ANGABEN ZU SEQ ID NO: 20:

(i) SEQUENZKENNZEICHEN:

(A) LÄNGE: 23 Basenpaare

(B) ART: Nucleotid

(C) STRANGFORM: Einzelstrang

(D) TOPOLOGIE: linear

(ii) ART DES MOLEKÜLS: Sonstige Nucleinsäure

(A) BESCHREIBUNG: /desc = "DNA-Oligonucleotide"

(iii) HYPOTHETISCH: NEIN

(iv) ANTISENSE: JA

(vi) URSPRÜNGLICHE HERKUNFT:

(A) ORGANISMUS: *Legionella moravica*

(xi) SEQUENZBESCHREIBUNG: SEQ ID NO: 20:

AGGCCTTGGG CTTGTTGATT GAA

23

EP 0 739 988 A1

(2) ANGABEN ZU SEQ ID NO: 21:

(i) SEQUENZKENNZEICHEN:

- (A) LÄNGE: 40 Basenpaare
- (B) ART: Nucleotid
- (C) STRANGFORM: Einzelstrang
- (D) TOPOLOGIE: linear

(ii) ART DES MOLEKÜLS: Sonstige Nucleinsäure

- (A) BESCHREIBUNG: /desc = "DNA-Oligonucleotide"

(iii) HYPOTHETISCH: NEIN

(iv) ANTISENSE: JA

(vi) URSPRÜNGLICHE HERKUNFT:

- (A) ORGANISMUS: Legionella sainthelensis

(xi) SEQUENZBESCHREIBUNG: SEQ ID NO: 21:

GTGCTGAATA TAAGATATAA TGTTACTCTC TTTATTACC

40

(2) ANGABEN ZU SEQ ID NO: 22:

(i) SEQUENZKENNZEICHEN:

- (A) LÄNGE: 25 Basenpaare
- (B) ART: Nucleotid
- (C) STRANGFORM: Einzelstrang
- (D) TOPOLOGIE: linear

(ii) ART DES MOLEKÜLS: Sonstige Nucleinsäure

- (A) BESCHREIBUNG: /desc = "DNA-Oligonucleotide"

(iii) HYPOTHETISCH: NEIN

(iv) ANTISENSE: JA

(vi) URSPRÜNGLICHE HERKUNFT:

- (A) ORGANISMUS: Legionella spiritensis

(xi) SEQUENZBESCHREIBUNG: SEQ ID NO: 22:

GTGTGCCCTG AAGAAGAAAC AGGGT

25

(2) ANGABEN ZU SEQ ID NO: 23:

(i) SEQUENZKENNZEICHEN:

- (A) LÄNGE: 28 Basenpaare
- (B) ART: Nucleotid
- (C) STRANGFORM: Einzelstrang
- (D) TOPOLOGIE: linear



EP 0 739 988 A1

- (ii) ART DES MOLEKÜLS: Sonstige Nucleinsäure
  - (A) BESCHREIBUNG: /desc = "DNA-Oligonucleotide"
- (iii) HYPOTHETISCH: NEIN
- (iv) ANTISENSE: JA
- (vi) URSPRÜNGLICHE HERKUNFT:
  - (A) ORGANISMUS: Legionella steigerwaltii
- (xi) SEQUENZBESCHREIBUNG: SEQ ID NO: 23:

AATGTGTATA CAAGCTGTAG GTTGGCCA

28

- (2) ANGABEN ZU SEQ ID NO: 24:
  - (i) SEQUENZKENNZEICHEN:
    - (A) LÄNGE: 30 Basenpaare
    - (B) ART: Nucleotid
    - (C) STRANGFORM: Einzelstrang
    - (D) TOPOLOGIE: linear
  - (ii) ART DES MOLEKÜLS: Sonstige Nucleinsäure
    - (A) BESCHREIBUNG: /desc = "DNA-Oligonucleotide"
  - (iii) HYPOTHETISCH: NEIN
  - (iv) ANTISENSE: JA
  - (vi) URSPRÜNGLICHE HERKUNFT:
    - (A) ORGANISMUS: Legionella wadsworthii
  - (xi) SEQUENZBESCHREIBUNG: SEQ ID NO: 24:

GTACGTACGA ATTAGAGATT GGGTCTAGGC

30

- (2) ANGABEN ZU SEQ ID NO: 25:
  - (i) SEQUENZKENNZEICHEN:
    - (A) LÄNGE: 31 Basenpaare
    - (B) ART: Nucleotid
    - (C) STRANGFORM: Einzelstrang
    - (D) TOPOLOGIE: linear
  - (ii) ART DES MOLEKÜLS: Sonstige Nucleinsäure
    - (A) BESCHREIBUNG: /desc = "DNA-Oligonucleotide"
  - (iii) HYPOTHETISCH: NEIN
  - (iv) ANTISENSE: JA
  - (vi) URSPRÜNGLICHE HERKUNFT:
    - (A) ORGANISMUS: Legionella
  - (xi) SEQUENZBESCHREIBUNG: SEQ ID NO: 25:

TTGTAGTAAT TGGCTGATTG TCTTGACCAT A

31

5 (2) ANGABEN ZU SEQ ID NO: 26:

(i) SEQUENZKENNZEICHEN:

(A) LÄNGE: 336 Basenpaare

(B) ART: Nucleotid

10 (C) STRANGFORM: Einzelstrang

(D) TOPOLOGIE: linear

(ii) ART DES MOLEKÜLS: Genom-DNA

15 (iii) HYPOTHETISCH: NEIN

(vi) URSPRÜNGLICHE HERKUNFT:

(A) ORGANISMUS: Legionella pneumophila

(B) STAMM: Philadelphia-1

20 (C) INDIVIDUUM/ISOLAT: Olphila

(xi) SEQUENZBESCHREIBUNG: SEQ ID NO: 26:

GCCTCCCTCA AGATGAGTTT TCCCATGAAG CCCGTTGAAG ACTACGACGT TGATAGGCAA	60
25 GGTGTGGAAG CGCAGTAATG CGTGAAGCTA ACTTGACTA ATTGGCTGAT TGTCTTGACC	120
ATATAATCTG AGTAACCTCA GAATRTGATA TTGATTGTA TACCTGATAM GTATCGTGTA	180
AACTCTGACT CTTTACCAA CCTGTGGCTT AATAAGCAA TCAAAGCCTC AGGTAAACCA	240
GTTTTCCTGG CGACTATAGC GATTGGAAC CACCTGATAC CATCTCGAAC TCAGAAAGTGA	300
30 AACATTTCGG CGCCAATGAT AGTGTGAGGC TTCCTC	336

(2) ANGABEN ZU SEQ ID NO: 27:

35 (i) SEQUENZKENNZEICHEN:

(A) LÄNGE: 336 Basenpaare

(B) ART: Nucleotid

(C) STRANGFORM: Einzelstrang

40 (D) TOPOLOGIE: linear

(ii) ART DES MOLEKÜLS: Genom-DNA

(iii) HYPOTHETISCH: NEIN

(vi) URSPRÜNGLICHE HERKUNFT:

45 (A) ORGANISMUS: Legionella pneumophila

(B) STAMM: Knoxville-1

(C) INDIVIDUUM/ISOLAT: 02knox

50 (xi) SEQUENZBESCHREIBUNG: SEQ ID NO: 27:

GCCTCCCTCA AGATGAGTTT TCCCATGAAG CCCGTTGAAG ACTACGACGT TGATAGGCAA	60
---	----

55

# EP 0 739 988 A1

5 GGTGTGGAAG CGCAGTAATG CGTGAAGCTA ACTTGTTACTA ATTGGCTGAT TGTCTTGACC 120  
 ATATAATCTG AGTGACTTCA GAATGTGATA TTGATTGTA TACGTGAAAC GTATCGTGTA 180  
 AACTCTGACT CTTTACCAAA CCTGTGGCTT AATATAGCAA TCAAAGCCTC AGGTAACCA 240  
 GTTTTCCTGG CGACTATAGC GATTGTGAAC CACCTGATAC CATCTCGAAC TCAGAAGTGA 300  
 AACATTTCCG CGCCAATGAT AGTGTGAGGC TTCCTC 336

10 (2) ANGABEN ZU SEQ ID NO: 28:

(i) SEQUENZKENNZEICHEN:

(A) LÄNGE: 336 Basenpaare

(B) ART: Nucleotid

15 (C) STRANGFORM: Einzelstrang

(D) TOPOLOGIE: linear

(ii) ART DES MOLEKÜLS: Genom-DNA

(iii) HYPOTHETISCH: NEIN

20 (vi) URSPRÜNGLICHE HERKUNFT:

(A) ORGANISMUS: Legionella pneumophila

(B) STAMM: Benidorm 030E

25 (C) INDIVIDUUM/ISOLAT: 04beni

(xi) SEQUENZBESCHREIBUNG: SEQ ID NO: 28:

GCCTCCCTCA AGATGAGTTT TCCCATGAAG CCCGTTGAAG ACTACGACGT TGATAGGCAA 60  
 30 GGTGTGGAAG CGCAGTAATG CGTGAAGCTA ACTTGTTACTA ATTGGCTGAT TGTCTTGACC 120  
 ATATAATCTG AGTGACTTCA GAATGTGATA TTGATTGTA TACGTGAAAC GTATCGTGTA 180  
 AACTCTGACT CTTTACCAAA CCTGTGGCTT AATAATGCAA TCAAAGCCTC AGGTAAMCCA 240  
 GTTTTCCTGG CGACTATAGC GATTGTGAAC CACCTGATAC CATCTCGAAC TCAGAAGTGA 300  
 35 AACATTTCCG CGCCAATGAT AGTGTGAGGC TTCCTC 336

(2) ANGABEN ZU SEQ ID NO: 29:

(i) SEQUENZKENNZEICHEN:

40 (A) LÄNGE: 336 Basenpaare

(B) ART: Nucleotid

(C) STRANGFORM: Einzelstrang

(D) TOPOLOGIE: linear

45 (ii) ART DES MOLEKÜLS: Genom-DNA

(iii) HYPOTHETISCH: NEIN

(vi) URSPRÜNGLICHE HERKUNFT:

50 (A) ORGANISMUS: Legionella pneumophila

(B) STAMM: France 5811

(C) INDIVIDUUM/ISOLAT: 05fran

55

# EP 0 739 988 A1

(x1) SEQUENZBESCHREIBUNG: SEQ ID NO: 29:

5	GCCTCCCTCA AGATGAGTTT TCCCATGAAG CCCGTTGAAG ACTACGACGT TGATAGGCAA	60
	GGTGTGGAAG CGCAGTAATG CGTGAAGCTA ACTTGTAATA ATTGGCTGAT TGTCTTGACC	120
	ATATAATCTG AGTRACTTCA GAATGTGATA TTGATTGTA TACCTGAWAC GTATCGTGTA	180
	AACTCTGACT CTTTACCAAM CCTGTGGCTT AATAWAGCAA TYAAAGCCTC AGGTAAACCA	240
10	GTTTCTCTGG CGACTATAGC GATTGTGAAC CACCTGATAC CATCTCGAAC TCAGAAGTGA	300
	AACATTTCGG CGCCAATGAT AGTGTGAGGC TTCCTC	336

(2) ANGABEN ZU SEQ ID NO: 30:

15	(i) SEQUENZKENNZEICHEN:
	(A) LÄNGE: 336 Basenpaare
	(B) ART: Nucleotid
20	(C) STRANGFORM: Einzelstrang
	(D) TOPOLOGIE: linear
	(ii) ART DES MOLEKÜLS: Genom-DNA
	(iii) HYPOTHETISCH: NEIN
25	(vi) URSPRÜNGLICHE HERKUNFT:
	(A) ORGANISMUS: Legionella pneumophila
	(B) STAMM: OLDA
	(C) INDIVIDUUM/ISOLAT: O6olda
30	(xi) SEQUENZBESCHREIBUNG: SEQ ID NO: 30:

	GCCTCCCTCA AGATGAGTTT TCCCATGNNN NNCGTTGAAG ACTACGACGT TGATAGGCAA	60
35	GGTGTGGAAG CGCAGTAATG CGTGAAGCTA ACTTGTAATA ATTGGCTGAT TGTCTTGACC	120
	ATATAATCTG AGTGACTTCA GATTATGATA TTGATTGTA TACGTGAAAC GTATCGTGTA	180
	AACTCTGACT CTTTACCAAA CCTGTGGCTT AACAYAGCAA TCAAAGCCTC AGGTAAATCCA	240
	GTTTCTCTGG CGACTATAGC GATTGTGAAC CACCTGATAC CATCTCGAAC TCAGAAGTGA	300
40	AACATTTCGG CGCCAATGAT AGTGTGAGGC TTCCTC	336

(2) ANGABEN ZU SEQ ID NO: 31:

45	(i) SEQUENZKENNZEICHEN:
	(A) LÄNGE: 335 Basenpaare
	(B) ART: Nucleotid
	(C) STRANGFORM: Einzelstrang
50	(D) TOPOLOGIE: linear
	(ii) ART DES MOLEKÜLS: Genom-DNA
	(iii) HYPOTHETISCH: NEIN

55

EP 0 739 988 A1

(vi) URSPRÜNGLICHE HERKUNFT:

(A) ORGANISMUS: Legionella pneumophila

(B) STAMM: Oxford 4032E

(C) INDIVIDUUM/ISOLAT: 07oxfo

(xi) SEQUENZBESCHREIBUNG: SEQ ID NO: 31:

GCCTCCCTCA AGATGAGTTT TCCCATGANN NNCGTGAAG ACTACGACGT TGATAGGCAA	60
GGTGTGGAAG CGCAGTAATG CGTGAAGCTA ACTTGACTA ATTGGCTGAT TGTCTTGACC	120
ATATAATCTG AGTGAATTCA GAATGTGATT TTGATTGTA TACGTGAAAC GTATCGTGTA	180
AACCTGACT CTTTACCAA CSTGTGGCTT AATAATGCAA TCAAGCCTCA GGTAAACCAG	240
TTTTCCTGGC GACTATAGCG ATTTGGAACC ACCTGATACC ATCTCGAACT CAGAAGTGAA	300
ACATTTCCGC GCCAATGATA GTGTGAGGCT TCCTC	335

(2) ANGABEN ZU SEQ ID NO: 32:

(i) SEQUENZKENNZEICHEN:

(A) LÄNGE: 336 Basenpaare

(B) ART: Nucleotid

(C) STRANGFORM: Einzelstrang

(D) TOPOLOGIE: linear

(ii) ART DES MOLEKÜLS: Genom-DNA

(iii) HYPOTHETISCH: NEIN

(vi) URSPRÜNGLICHE HERKUNFT:

(A) ORGANISMUS: Legionella pneumophila

(B) STAMM: Camperdown-1

(C) INDIVIDUUM/ISOLAT: 08Camp

(xi) SEQUENZBESCHREIBUNG: SEQ ID NO: 32:

GCCTCCCTCA AGATGAGTTT TCCCATGAAG CCCGTTGAAG ACTACGACGT TGATAGGCAA	60
GGTGTGGAAG CGCAGTAATG CGTGAAGCTA ACTTGACTA ATTGGCTGAT TGTCTTGACC	120
ATATAATCTG AGTGAATTCA GATTATGATA TTGATTGTA TACGTGAAAC GTATCGTGTA	180
AACCTGACT CTTTACCAA CCTGTGGCTT AACATAGCAA TCAAGCCTC AGGTAATCCA	240
GTTTTCCTGG CGACTATAGC GATTGGAAC CACCTGATAC CATCTCGAAC TCAGAAGTGA	300
AACATTTCCG CGCCAATGAT AGTGTGAGGC TTCCTC	336

(2) ANGABEN ZU SEQ ID NO: 33:

(i) SEQUENZKENNZEICHEN:

(A) LÄNGE: 336 Basenpaare

(B) ART: Nucleotid

EP 0 739 988 A1

- (C) STRANGFORM: Einzelstrang  
 (D) TOPOLOGIE: linear  
 5 (ii) ART DES MOLEKÜLS: Genom-DNA  
 (iii) HYPOTHETISCH: NEIN  
 (vi) URSPRÜNGLICHE HERKUNFT:  
 10 (A) ORGANISMUS: Legionella pneumophila  
 (B) STAMM: Togus-1  
 (C) INDIVIDUUM/ISOLAT: 09tog  
 (xi) SEQUENZBESCHREIBUNG: SEQ ID NO: 33:

15 GCCTCCCTCA AGATGAGTTT TCCCATGAAG CCCGTTGAAG ACTACGACGT TGATAGGCAA 60  
 GGTGTGGAAG CGCAGTAATG CGTGAAGCTA ACTTGCTACTA ATTGGCTGAT TGTCTTGACC 120  
 ATATAATCTG AGTGACTTCA GAATGTGATA TTGATTGTA TACCTGATAA GTATCGTGTA 180  
 20 AACTCTGACT CTTTACCAA CCTGTGGCTT AATAAGCAA TMAAGCCTC AGGTAAMCCA 240  
 GTTTCCTGG CGACTATAGC GATTGGAAC CACCTGATAC CATCTCGAAC TCAGAAGTGA 300  
 AACATTCCG CGCCAATGAT AGTGTGAGGC TTCCTC 336

- 25 (2) ANGABEN ZU SEQ ID NO: 34:  
 (i) SEQUENZKENNZEICHEN:  
 (A) LÄNGE: 336 Basenpaare  
 30 (B) ART: Nucleotid  
 (C) STRANGFORM: Einzelstrang  
 (D) TOPOLOGIE: linear  
 (ii) ART DES MOLEKÜLS: Genom-DNA  
 35 (iii) HYPOTHETISCH: NEIN  
 (vi) URSPRÜNGLICHE HERKUNFT:  
 (A) ORGANISMUS: Legionella pneumophila  
 40 (B) STAMM: Bloomington-2  
 (C) INDIVIDUUM/ISOLAT: 10Bloom  
 (xi) SEQUENZBESCHREIBUNG: SEQ ID NO: 34:

45 GCCTCCCTCA AGATGAGTTT TCCCATGANN NCCGTTGAAG ACTACGACGT TGATAGGCAA 60  
 GGTGTGGAAG CGCAGTAATG CGTGAAGCTA ACTTGCTACTA ATTGGCTGAT TGTCTTGACC 120  
 ATATAATCTG AGTGACTTCA GAATGTGATA TTGATTGTA TACGTGAAAC GTATCGTGTA 180  
 AACTCTGACT CTTTACCAA CCTGTGGCTT AATATAGCAA TCAAAGCCTC AGGTAAACCA 240  
 50 GTTTCCTGG CGACTATAGC GATTGGAAC CACCTGATAC CATCTCGAAC TCAGAAGTGA 300  
 AACATTCCG CGCCAATGAT AGTGTGAGGC TTCCTC 336

55

EP 0 739 988 A1

(2) ANGABEN ZU SEQ ID NO: 35:

(i) SEQUENZKENNZEICHEN:

- (A) LÄNGE: 336 Basenpaare
- (B) ART: Nucleotid
- (C) STRANGFORM: Einzelstrang
- (D) TOPOLOGIE: linear

(ii) ART DES MOLEKÜLS: Genom-DNA

(iii) HYPOTHETISCH: NEIN

(vi) URSPRÜNGLICHE HERKUNFT:

- (A) ORGANISMUS: Legionella pneumophila
- (B) STAMM: Los Angeles-1
- (C) INDIVIDUUM/ISOLAT: 11sg41a

(xi) SEQUENZBESCHREIBUNG: SEQ ID NO: 35:

GCCTCCCTCA AGATGAGTTT TCCCATGNNN NNCGTTGAAG ACTACGACGT TGATAGGCAA	60
GGTGTGGAAG CGCAGTAATG CGTGAAGCTA ACTTGACTA ATTGGCTGAT TGTCTTGACC	120
ATATAATCTG AGTGACTTCA GAATGTATAA TTGAATTGAA TACGTACAAC GCATCGTGTA	180
AACTCCGACT CTTTACCAAA CCTGTGGCTT AATAGTGTA TCAAAGCCTC AGGTAAACCA	240
GTTTTCCTGG CGACTATAGC GATTGGAAC CACCTGATAC CATCTCGAAC TCAGAAAGTA	300
AACATTTCGG CGCCAATGAT AGTGTGAGGC TTCCTC	336

(2) ANGABEN ZU SEQ ID NO: 36:

(i) SEQUENZKENNZEICHEN:

- (A) LÄNGE: 336 Basenpaare
- (B) ART: Nucleotid
- (C) STRANGFORM: Einzelstrang
- (D) TOPOLOGIE: linear

(ii) ART DES MOLEKÜLS: Genom-DNA

(iii) HYPOTHETISCH: NEIN

(vi) URSPRÜNGLICHE HERKUNFT:

- (A) ORGANISMUS: Legionella pneumophila
- (B) STAMM: Portland
- (C) INDIVIDUUM/ISOLAT: 12sg4po

(xi) SEQUENZBESCHREIBUNG: SEQ ID NO: 36:

GCCTCCCTCA AGATGAGTTT TCCCATGAAG CCCGTTGAAG ACTACGACGT TGATAGGCAA	60
GGTGTGGAAG CGCAGTAATG CGTGAAGCTA ACTTGACTA ATTGGCTGAT TGTCTTGACC	120
ATATAATCTG AGTAACTTCA GAATRTGATA TTGATTGTA TACCTGATAM GTATCGTGTA	180
AACTCTGACT CTTTACCAAA CCTGTGGCTT AATAAAGCAA TCAAAGCCTC AGGTAAACCA	240

# EP 0 739 988 A1

GTTTTCCTGG CGACTATAGC GATTTGAAC CACCTGATAC CATCTCGAAC TCAGAAGTGA 300  
AACATTTCCG CGCCAATGAT AGTGTGAGGC TTCCTC 336

5

(2) ANGABEN ZU SEQ ID NO: 37:

(i) SEQUENZKENNZEICHEN:

(A) LÄNGE: 336 Basenpaare

10

(B) ART: Nucleotid

(C) STRANGFORM: Einzelstrang

(D) TOPOLOGIE: linear

(ii) ART DES MOLEKÜLS: Genom-DNA

15

(iii) HYPOTHETISCH: NEIN

(vi) URSPRÜNGLICHE HERKUNFT:

(A) ORGANISMUS: Legionella pneumophila

(B) STAMM: Dallas-1E

20

(C) INDIVIDUUM/ISOLAT: 13sg5da

(xi) SEQUENZBESCHREIBUNG: SEQ ID NO: 37:

25

GCCTCCCTCA AGATGAGTTT TCCCATGAAG CCCGTTGAAG ACTACGACGT TGATAGGCAA 60  
GGTGTGAAG CGCAGTAATG YGTGAAGCTA ACTTGACTA ATTGGCTGAT TGTCTTGACC 120  
ATATAATCTG AGTGACTTCA GAATGTATAA TTGAATTGAA TACGTACAAC GCATCGTGTA 180  
AACTCCGACT CTTTACCAA CCTGTGGCTT AATAGTGTA TCAAAGCCTC AGGTAAACCA 240  
GTTTTCCTGG CGACTATAGC GATTTGAAC CACCTGATAC CATCTCGAAC TCAGAAGTGA 300  
AACATTTCCG CGCCAATGAT AGTGTGAGGC TTCCTC 336

30

(2) ANGABEN ZU SEQ ID NO: 38:

35

(i) SEQUENZKENNZEICHEN:

(A) LÄNGE: 336 Basenpaare

(B) ART: Nucleotid

(C) STRANGFORM: Einzelstrang

40

(D) TOPOLOGIE: linear

(ii) ART DES MOLEKÜLS: Genom-DNA

(iii) HYPOTHETISCH: NEIN

(vi) URSPRÜNGLICHE HERKUNFT:

45

(A) ORGANISMUS: Legionella pneumophila

(B) STAMM: Cambridge-2

(C) INDIVIDUUM/ISOLAT: 14sg5cam

50

(xi) SEQUENZBESCHREIBUNG: SEQ ID NO: 38:

GCCTCCCTCA AGATGAGTTT TCCCATGAAG CCCGTTGAAG ACTACGACGT TGATAGGCAA 60

55



# EP 0 739 988 A1

GGTGTGGAAG CGCAGTAATG CGTGAAGCTA ACTTGTAATA ATTGGCTGAT TGTCTTGACC 120  
 ATATAATCTG AGTGACTTCA GAATGTGATA TTGATTGTGA TACGTGAAAC GTATCGTGTA 180  
 5 AACTCTGACT CTTTACCAAA CCTGTGGCTT AATACAGCAA TCAAAGCCTC AGGTAAACCA 240  
 GTTTTCCTGG CGACTATAGC GATTTGGAAC CACCTGATAC CATCTCGAAC TCAGAAGTGA 300  
 AACATTTCGG CGCCAATGAT AGTGTGAGGC TTCCTC 336

- (2) ANGABEN ZU SEQ ID NO: 39:
- (i) SEQUENZKENNZEICHEN:
    - (A) LÄNGE: 336 Basenpaare
    - (B) ART: Nucleotid
    - 15 (C) STRANGFORM: Einzelstrang
    - (D) TOPOLOGIE: linear
  - (ii) ART DES MOLEKÜLS: Genom-DNA
  - 20 (iii) HYPOTHETISCH: NEIN
  - (vi) URSPRÜNGLICHE HERKUNFT:
    - (A) ORGANISMUS: Legionella pneumophila
    - (B) STAMM: Chicago-2
    - 25 (C) INDIVIDUUM/ISOLAT: 15sg6ch
  - (xi) SEQUENZBESCHREIBUNG: SEQ ID NO: 39:

GCCTCCCTCA AGATGAGTTT TCCCATGANN NNCGTTGAAG ACTACGACGT TGATAGGCAA 60  
 30 GGTGTGGAAG CGCAGTAATG CGTGAAGCTA ACTTGTAATA ATTGGCTGAT TGTCTTGACC 120  
 ATATAATCTG AGTAACTTCA GAATATGATA TTGATTGTGA TACCTGATAM GTATCGTGTA 180  
 AACTCTGACT CTTTACCAAA CCTGTGGCTT AATAAGCAA TCAAAGCCTC AGGTAAACCA 240  
 GTTTTCCTGG CGACTATAGC GATTTGGAAC CACCTGATAC CATCTCGAAC TCAGAAGTGA 300  
 35 AACATTTCGG CGCCAATGAT AGTGTGAGGC TTCCTC 336

- (2) ANGABEN ZU SEQ ID NO: 40:
- (i) SEQUENZKENNZEICHEN:
    - (A) LÄNGE: 336 Basenpaare
    - (B) ART: Nucleotid
    - 40 (C) STRANGFORM: Einzelstrang
    - (D) TOPOLOGIE: linear
  - 45 (ii) ART DES MOLEKÜLS: Genom-DNA
  - (iii) HYPOTHETISCH: NEIN
  - (vi) URSPRÜNGLICHE HERKUNFT:
    - (A) ORGANISMUS: Legionella pneumophila
    - 50 (B) STAMM: Chicago-8
    - (C) INDIVIDUUM/ISOLAT: 16sg7

55

# EP 0 739 988 A1

(xi) SEQUENZBESCHREIBUNG: SEQ ID NO: 40:

5	GCCTCCCTCA AGATGAGTTT TCCCATGAAG CCCGTTGAAG ACTACGACGT TGATAGGCAA	60
	GGTGTGGAAG CGCAGTAATG CGTGAAGCTA ACTTGTTACTA ATTGGCTGAT TGTCTTGACC	120
	ATATAATCTG AGTGACTTCA GAATGTGATA TTGATTGTA TACGTGAAAC GTATCGTGTA	180
	AACTCTGACT CTTTACCAA CCTGTGGCTT AATATAGCAA TCAAAGCCTC AGGTAAACCA	240
10	GTTTTCCTGG CGACTATAGC GATTGTGAAC CACCTGATAC CATCTCGAAC TCAGAAGTGA	300
	AACATTTCGG CGCCAATGAT AGTGTGAGGA CTCCTC	336

(2) ANGABEN ZU SEQ ID NO: 41:

- 15 (i) SEQUENZKENNZEICHEN:
- (A) LÄNGE: 336 Basenpaare
  - (B) ART: Nucleotid
  - 20 (C) STRANGFORM: Einzelstrang
  - (D) TOPOLOGIE: linear
  - (ii) ART DES MOLEKÜLS: Genom-DNA
  - (iii) HYPOTHETISCH: NEIN
  - 25 (vi) URSPRÜNGLICHE HERKUNFT:
  - (A) ORGANISMUS: Legionella pneumophila
  - (B) STAMM: Concord-3
  - (C) INDIVIDUUM/ISOLAT: 17sg8

30 (xi) SEQUENZBESCHREIBUNG: SEQ ID NO: 41:

	GCCTCCCTCA AGATGAGTTT TCCCATGAAG CCCGTTGAAG ACTACGACGT TGATAGGCAA	60
35	GGTGTGGAAG CGCAGTAATG CGTGAAGCTA ACTTGTTACTA ATTGGCTGAT TGTCTTGACC	120
	ATATAATCTG AGTGACTTCA GAATGTGATA TTGATTGTA TACGTGAAAC GTATCGTGTA	180
	AACTCTGACT CTTTACCAA CCTGTGGCTT AATAAGCAA GAAAAGCCTC AGGTAAACCA	240
	GTTTTCCTGG CGACTATAGC GATTGTGAAC CACCTGATAC CATCTCGAAC TCAGAAGTGA	300
40	AACATTTCGG CGCCAATGAT AGTGTGAGGT CTCCTC	336

(2) ANGABEN ZU SEQ ID NO: 42:

- 45 (i) SEQUENZKENNZEICHEN:
- (A) LÄNGE: 336 Basenpaare
  - (B) ART: Nucleotid
  - (C) STRANGFORM: Einzelstrang
  - 50 (D) TOPOLOGIE: linear
  - (ii) ART DES MOLEKÜLS: Genom-DNA
  - (iii) HYPOTHETISCH: NEIN

55

EP 0 739 988 A1

(vi) URSPRÜNGLICHE HERKUNFT:

(A) ORGANISMUS: Legionella pneumophila

(B) STAMM: IN-23-G1-C2

(C) INDIVIDUUM/ISOLAT: 18sg9

(xi) SEQUENZBESCHREIBUNG: SEQ ID NO: 42:

GCCTCCCTCA AGATGAGTTT TCCCATGANN NCCGTTGAAG ACTACGACGT TGATAGGCAA 60  
GGTGTGGAAG CGCAGTAATG CGTGAAGCTA ACTTGACTA ATTGGCTGAT TGTCTTGACC 120  
ATATAATCTG AGTGACTTCA GATTATGATA TTGATTGTA TACGTGAAAC GTATCGTGTA 180  
AACTCTGACT CTTTACCAA CCTGTGGCTT AACATAGCAA TCAAAGCCTC AGGTAATCCA 240  
GTTTTCTGG CGACTATAGC GATTGGAAC CACCTGATAC CATCTCGAAC TCAGAAGTGA 300  
AACATTTCCG CGCCAATGAT AGTGTGAGGC TTCCTC 336

(2) ANGABEN ZU SEQ ID NO: 43:

(i) SEQUENZKENNZEICHEN:

(A) LÄNGE: 336 Basenpaare

(B) ART: Nucleotid

(C) STRANGFORM: Einzelstrang

(D) TOPOLOGIE: linear

(ii) ART DES MOLEKÜLS: Genom-DNA

(iii) HYPOTHETISCH: NEIN

(vi) URSPRÜNGLICHE HERKUNFT:

(A) ORGANISMUS: Legionella pneumophila

(B) STAMM: Leiden-1

(C) INDIVIDUUM/ISOLAT: 19sg10

(xi) SEQUENZBESCHREIBUNG: SEQ ID NO: 43:

GCCTCCCTCA AGATGAGTTT TCCCATGNNN NNCGTTGAAG ACTACGACGT TGATAGGCAA 60  
GGTGTGGAAG CGCAGTAATG CGTGAAGCTA ACTTGACTA ATTGGCTGAT TGTCTTGACC 120  
ATATAATCTG AGTGACTTCA GAATGTGATA TTGATTGTA TACGTGAAAC GTATCGTGTA 180  
AACTCTGACT CTTTACCAA CCTGTGGCTT AAYAYAGCAA TCAAAGCCTC AGGTAACCA 240  
GTTTTCTGG CGACTATAGC GATTGGAAC CACCTGATAC CATCTCGAAC TCAGAAGTGA 300  
AACATTTCCG CGCCAATGAT AGTGTGAGGC TTCCTC 336

(2) ANGABEN ZU SEQ ID NO: 44:

(i) SEQUENZKENNZEICHEN:

(A) LÄNGE: 336 Basenpaare

(B) ART: Nucleotid

# EP 0 739 988 A1

(C) STRANGFORM: Einzelstrang  
 (D) TOPOLOGIE: linear  
 5 (ii) ART DES MOLEKÜLS: Genom-DNA  
 (iii) HYPOTHETISCH: NEIN  
 (vi) URSPRÜNGLICHE HERKUNFT:  
 (A) ORGANISMUS: Legionella pneumophila  
 10 (B) STAMM: 797-PA-H  
 (C) INDIVIDUUM/ISOLAT: 20sg11  
 (xi) SEQUENZBESCHREIBUNG: SEQ ID NO: 44:

15 GCCTCCCTCA AGATGAGTTT TCCCATGAAG CCCGTTGAAG ACTACGACGT TGATAGGCAA 60  
 GGTGTGGAAG CGCAGTAATG CGTGAAGCTA ACTTGACTA ATTGGCTGAT TGTCTTGACC 120  
 ATATAATCTG AGTGACTTCA GAATGTGATA TTGATTGTA TACGTGAAAC GTATCGTGTA 180  
 AACTCTGACT CTTTACCAA CCTGTGGCTT AATAATGCAA TCAAAGCCTC AGGTAAMCCA 240  
 20 GTTTTCCTGG CGMCTATAGC GATTTGGAAC CACCTGATAC CATCTCGAAC TCAGAAGTGA 300  
 AACATTTCGG CGCCAATGAT AGTGTGAGGC TTCCTC 336

25 (2) ANGABEN ZU SEQ ID NO: 45:  
 (i) SEQUENZKENNZEICHEN:  
 (A) LÄNGE: 336 Basenpaare  
 (B) ART: Nucleotid  
 30 (C) STRANGFORM: Einzelstrang  
 (D) TOPOLOGIE: linear  
 (ii) ART DES MOLEKÜLS: Genom-DNA  
 (iii) HYPOTHETISCH: NEIN  
 35 (vi) URSPRÜNGLICHE HERKUNFT:  
 (A) ORGANISMUS: Legionella pneumophila  
 (B) STAMM: 570-CO-H  
 (C) INDIVIDUUM/ISOLAT: 21sg12  
 40 (xi) SEQUENZBESCHREIBUNG: SEQ ID NO: 45:

GCCTCCCTCA AGATGAGTTT TCCCATGNNN NNCGNNGAAG ACTACGACGT TGATAGGCAA 60  
 GGTGTGGAAG CGCAGTAATG CGTGAAGCTA ACTTGACTA ATTGGCTGAT TGTCTTGACC 120  
 45 ATATAATCTG AGTAACTTCA GAATRTGATA TTGATTGTA TACCTGATAM GTATCGTGTA 180  
 AACTCTGACT CTTTACCAA CCTGTGGCTT AATAAAGCAA TCAAAGCCTC AGGTAAACCA 240  
 GTTTTCCTGG CGACTATAGC GATTTGGAAC CACCTGATAC CATCTCGAAC TCAGAAGTGA 300  
 50 AACATTTCGG CGCCAATGAT AGTGTGAGGC TTCCTC 336

(2) ANGABEN ZU SEQ ID NO: 46:

55

# EP 0 739 988 A1

## (i) SEQUENZKENNZEICHEN:

- (A) LÄNGE: 336 Basenpaare
- (B) ART: Nucleotid
- (C) STRANGFORM: Einzelstrang
- (D) TOPOLOGIE: linear
- (ii) ART DES MOLEKÜLS: Genom-DNA
- (iii) HYPOTHETISCH: NEIN
- (vi) URSPRÜNGLICHE HERKUNFT:
  - (A) ORGANISMUS: Legionella pneumophila
  - (B) STAMM: 82-A-3105
  - (C) INDIVIDUUM/ISOLAT: 22sg13
- (xi) SEQUENZBESCHREIBUNG: SEQ ID NO: 46:

```

20 GCCTCCCTCA AGATGAGTTT TCCCATGAAG CCCGTTGAAG ACTACGACGT TGATAGGCAA      60
   GGTGTGGAAG CGCAGTAATG CGTGAAGCTA ACTTGTAATA ATTGGCTGAT TGTCTTGACC      120
   ATATAATCTG AGTGACTTCA GAATGTGATA TTGATTGTA TACGTGAAAC GTATCGTGTA      180
   AACTCTGACT CTTTACCAA CCTGTGGCTT AATACAGCAA TCAAAGCCTC AGGTAAACCA      240
   GTTTTCCTGG CGACTATAGC GATTTGGAAC CACCTGATAC CATCTCGAAC TCAGAAGTGA      300
25 AACATTTCGG CGCCAATGAT AGTGTGAGGC TTCCTC                                336
  
```

## (2) ANGABEN ZU SEQ ID NO: 47:

- (i) SEQUENZKENNZEICHEN:
  - (A) LÄNGE: 336 Basenpaare
  - (B) ART: Nucleotid
  - (C) STRANGFORM: Einzelstrang
  - (D) TOPOLOGIE: linear
- (ii) ART DES MOLEKÜLS: Genom-DNA
- (iii) HYPOTHETISCH: NEIN
- (vi) URSPRÜNGLICHE HERKUNFT:
  - (A) ORGANISMUS: Legionella pneumophila
  - (B) STAMM: 1169-MN-H
  - (C) INDIVIDUUM/ISOLAT: 23sg14
- (xi) SEQUENZBESCHREIBUNG: SEQ ID NO: 47:

```

45 GCCTCCCTCA AGATGAGTTT TCCCATGAAG CCCGTTGAAG ACTACGACGT TGATAGGCAA      60
   GGTGTGGAAG CGCAGTAATG CGTGAAGCTA ACTTGTAATA ATTGGCTGAT TGTCTTGACC      120
   ATATAATCTG AGTGACTTCA GAATGTGATA TTGATTGTA TACGTGAAAC GTATCGTGTA      180
50 AACTCTGACT CTTTACCAA CCTGTGGCTT AAYAYAGCAA TCAAAGCCTC AGGTAAACCA      240
   GTTTTCCTGG CGACTATAGC GATTTGGAAC CACCTGATAC CATCTCGAAC TCAGAAGTGA      300
  
```

# EP 0 739 988 A1

AACATTTCCG CGCCAATGAT AGTGTGAGGC TTCCTC

336

5 (2) ANGABEN ZU SEQ ID NO: 48:

(i) SEQUENZKENNZEICHEN:

(A) LÄNGE: 374 Basenpaare

(B) ART: Nucleotid

10 (C) STRANGFORM: Einzelstrang

(D) TOPOLOGIE: linear

(ii) ART DES MOLEKÜLS: Genom-DNA

(iii) HYPOTHETISCH: NEIN

15 (vi) URSPRÜNGLICHE HERKUNFT:

(A) ORGANISMUS: Legionella anisa

(B) STAMM: WA-316-C2

(C) INDIVIDUUM/ISOLAT: 24ani

20 (xi) SEQUENZBESCHREIBUNG: SEQ ID NO: 48:

GAAGCCTCCC	TCAAGATGAG	TTTCCCCTG	AAGCCCGTTG	AAGACTACGA	CGTTGATAGG	60
CAAGGTGTGG	AAGCACAGTA	ATGTGTGAAG	CTAACTGTGA	CTAATTGGCT	GATTGTCTTG	120
ACCATATAAT	CTGAGTTACT	TCAGATTGTG	AATGCCAATA	CAAGATGTAG	GTTGGGCCAA	180
GGCTCAACCT	ACGCAGAACT	ACTTGAACA	AAGTGTGAAC	TTCTTTATTT	ACCTAATGCT	240
TGATTGAGGT	ATAATGCCTT	ACAATCAATG	CAAAACCAGT	TTTCCTGGCG	ACCATAGCGG	300
TTTGAACCA	CCTGAATCCA	TCTCGAACTC	AGAAGTGAAA	CGAACCCGCG	CCAATGATAG	360
TGTGAGGTTT	CCTC					374

(2) ANGABEN ZU SEQ ID NO: 49:

35 (i) SEQUENZKENNZEICHEN:

(A) LÄNGE: 350 Basenpaare

(B) ART: Nucleotid

(C) STRANGFORM: Einzelstrang

40 (D) TOPOLOGIE: linear

(ii) ART DES MOLEKÜLS: Genom-DNA

(iii) HYPOTHETISCH: NEIN

(vi) URSPRÜNGLICHE HERKUNFT:

45 (A) ORGANISMUS: Legionella brunensis

(xi) SEQUENZBESCHREIBUNG: SEQ ID NO: 49:

GCCTCCCTCA	AGATGAGTTT	TCCCATGAAG	CCCGTTGAAG	ACTACGACGT	TGATAGGCGA	60
GGTGTGGAAG	CGCAGTAATG	TGTGAAGCTA	ACTCGTACTA	ATTGGCTGAT	TGTCTTGACC	120
ATATAACCTG	AATGACTTCG	GGTTATGATA	GAAGATGATA	GATTATGCCG	TAAGGCACTT	180

55

# EP 0 739 988 A1

GTGTTAACCC TTTTACTT TACCAGCCTG TTTTACAGA GCACTTAACA ATGCTCTTTA 240  
TCAACAGGAC AACAGTTTTC CTGGCGACCA TAGCGGTTTG GAACCACCTG ACTCCATCTC 300  
5 GAACTCAGTA GTGAAACAGA CCAGCGCCGA TGATAGTGTG AGGCTTCCTC 350

(2) ANGABEN ZU SEQ ID NO: 50:

(i) SEQUENZKENNZEICHEN:

- (A) LÄNGE: 317 Basenpaare
- (B) ART: Nucleotid
- (C) STRANGFORM: Einzelstrang
- (D) TOPOLOGIE: linear

(ii) ART DES MOLEKÜLS: Genom-DNA

(iii) HYPOTHETISCH: NEIN

(vi) URSPRÜNGLICHE HERKUNFT:

- (A) ORGANISMUS: Legionella cincinnatiensis
- (B) STAMM: 72-OH-H
- (C) INDIVIDUUM/ISOLAT: 29cin

(xi) SEQUENZBESCHREIBUNG: SEQ ID NO: 50:

GCCTCCCTCA AGCTGAGTTT TCCCTTGAAG CCCGTTGAAG ACTACGACGT TGATAGGCAA 60  
GGTGTGGAAG CGTAGTAATG CGTGAAGCTA ACTTGCTACTA ATTGGCTGAT TGTCTTGACC 120  
ATATAATCTG AGTTACTTCA GAGTGAACA GAATATAAGT GACACCATGA CTCTCTTTRT 180  
TTACCGGAAG TAACGCGCTC CAAGGCGCGC TACTCAAAAC AGTTTTCCTG GCGACCATAG 240  
CGGTTTGGA CCACCTGATT CCATCTCGAA CTCAGTAGTG AAACGAACAT GCGCCAATGA 300  
TAGTGTGAGG TTCCTC 317

(2) ANGABEN ZU SEQ ID NO: 51:

(i) SEQUENZKENNZEICHEN:

- (A) LÄNGE: 359 Basenpaare
- (B) ART: Nucleotid
- (C) STRANGFORM: Einzelstrang
- (D) TOPOLOGIE: linear

(ii) ART DES MOLEKÜLS: Genom-DNA

(iii) HYPOTHETISCH: NEIN

(vi) URSPRÜNGLICHE HERKUNFT:

- (A) ORGANISMUS: Legionella dumoffii
- (B) STAMM: NY-23
- (C) INDIVIDUUM/ISOLAT: 31DUMO

(xi) SEQUENZBESCHREIBUNG: SEQ ID NO: 51:

# EP 0 739 988 A1

5 GCCTCCCTCA AGATGAGTTT TCCCATGAAG CCCGTTGGAG ACTACGACGT TGATAGGCAA 60  
GGTGTGGAAG CGCAGTAATG CGTGCAGCTA ACTTGACTA ATTGGCTGAT TGTCTTGACC 120  
ATATAATCTG AGTTACTTCA GATGAACTGA ATCAATACCT GGGGTAGGAC ACCTGCCCCC 180  
AAATAAATAC AAAATAGTGT GTCCTCTTTA TTTACCTCGT GCATGATTGG GGTATAATAT 240  
GCCCAATTGA TCATGTCAAA CCAGTTTTC TGGCGACCAT AGCGGTTTGG AACCACCTGA 300  
ATCCATCTCG AACTCAGAAG TGAAACGAAC ATGCGCCAAT GATAGTGTGA GGCTTCCTC 359

## (2) ANGABEN ZU SEQ ID NO: 52:

### (i) SEQUENZKENNZEICHEN:

(A) LÄNGE: 362 Basenpaare

(B) ART: Nucleotid

(C) STRANGFORM: Einzelstrang

(D) TOPOLOGIE: linear

(ii) ART DES MOLEKÜLS: Genom-DNA

(iii) HYPOTHETISCH: NEIN

(vi) URSPRÜNGLICHE HERKUNFT:

(A) ORGANISMUS: Legionella cherrii

(B) STAMM: ORW

(C) INDIVIDUUM/ISOLAT: 30che

(xi) SEQUENZBESCHREIBUNG: SEQ ID NO: 52:

30 GCCTCCCTCA AGATGAGTTT TCCCATGAAG CCCGTTGAAG ACTACGACGT TGATAGGCAA 60  
GGTGTGGAAG CACAGTAATG TGTGCAGCTA ACTTGACTA ATTGGCTGAT TGTCTTGACC 120  
ATATAATCTG AATTACTTCA GATTAAGTGA ATGCAATAC AAGAAATTTA GGTGGGCCA 180  
CGGCCCAATC TGCAAAAAAA ATGTGTACTC TTTATTTACC TAACGCATGA TTCGGGTATA 240  
35 ATGCGCCCAT TAATCATGTT AAACCAAGTT TCCTGGCGAC CATAGCGGTT TGAACCACC 300  
TGACTCCATC TCGAACTCAG AAGTGAAACG AACCCGCGCC AATGATAGTG TGAGGTTTCC 360  
TC 362

## (2) ANGABEN ZU SEQ ID NO: 53:

### (i) SEQUENZKENNZEICHEN:

(A) LÄNGE: 325 Basenpaare

(B) ART: Nucleotid

(C) STRANGFORM: Einzelstrang

(D) TOPOLOGIE: linear

(ii) ART DES MOLEKÜLS: Genom-DNA

(iii) HYPOTHETISCH: NEIN

(vi) URSPRÜNGLICHE HERKUNFT:

(A) ORGANISMUS: Legionella erythra



EP 0 739 988 A1

(B) STAMM: SE-32A-C8

(C) INDIVIDUUM/ISOLAT: 32ERY

5 (xi) SEQUENZBESCHREIBUNG: SEQ ID NO: 53:

GCCTCCCTCA AGATGAGTTT TCCCATGAAG CCCGTTGAAG ACTACGACGT TGATAGGCCGA	60
GGTGTGGAAG CGTAGTAATG CGTGAAGCTA ACTCGTACTA ATTGGCTGAT TGTCTTGACT	120
10 ATATAACCTG ATGCGCTTCA GGTATATGG ATAACATGAA TGTGACTCTA TTTTACC	180
GCCTCGTGGC CAACCCGGGT AAGACCGGAA AAACCATGAT GCTTAAACCG TTTTCTGGC	240
GACCATAGCA GTTTGGAACC ACCTGAATCC ATCTCGAACT CAGAAGTGAA ACAGACTCGC	300
15 GCCGATGATA GTGTGAGGCT TCCTC	325

(2) ANGABEN ZU SEQ ID NO: 54:

(i) SEQUENZKENNZEICHEN:

20 (A) LÄNGE: 342 Basenpaare
(B) ART: Nucleotid
(C) STRANGFORM: Einzelstrang
(D) TOPOLOGIE: linear

25 (ii) ART DES MOLEKÜLS: Genom-DNA

(iii) HYPOTHETISCH: NEIN

(vi) URSPRÜNGLICHE HERKUNFT:

30 (A) ORGANISMUS: Legionella feeleii
(B) STAMM: WO-44C
(C) INDIVIDUUM/ISOLAT: 33feel

(xi) SEQUENZBESCHREIBUNG: SEQ ID NO: 54:

35 GCCTCCCTCA AGATGAGTTT TCCCATGAAG CCCGTTGAAG ACTACGACGT TGATAGGCCGA	60
GGTGTGGAAG CGCAGTAATG CGTGAAGCTA ACTCGTACTA ATTGGCTGAT TGTCTTGACC	120
ATATAACCTG AATTGCTTTG AGGTTATAGG CAAAAATGAA AGACAAATCC GTTTGTGTTA	180
40 CCTCATAATC TTTACCGGCC TGCTGGCTGA GCACTTAACC CTGCTTTATC CAGAACAGGC	240
AAACCCGTTT TCCTGGCGAC CATAGCGGTT TGGAACCACC TGAATCCATC TCGAACTCAG	300
AAGTGAAACA AACCCGCGCC GATGATAGTG TGGAGTTTCT CC	342

45 (2) ANGABEN ZU SEQ ID NO: 55:

(i) SEQUENZKENNZEICHEN:

50 (A) LÄNGE: 349 Basenpaare
(B) ART: Nucleotid
(C) STRANGFORM: Einzelstrang
(D) TOPOLOGIE: linear

(ii) ART DES MOLEKÜLS: Genom-DNA

55

EP 0 739 988 A1

(iii) HYPOTHETISCH: NEIN

(vi) URSPRÜNGLICHE HERKUNFT:

(A) ORGANISMUS: *Legionella feeleeii*

(B) STAMM: 691-WI-H

(C) INDIVIDUUM/ISOLAT: 34feel

(xi) SEQUENZBESCHREIBUNG: SEQ ID NO: 55:

GCGGGAAGCC	TCCCTCAAGA	TGAGTTTTC	CATGAAGCCC	GTTGAAGACT	ACGACGTTGA	60
TAGGCGAGGT	GTGGAAGCGC	AGTAATGCGT	GAAGCTAACT	CGTACTAATT	GGCTGATTGT	120
CTTGACCATA	TAACCTGAAT	TGCTTTGAGG	TTATAGGCAA	AAATGAAAGA	CAATGCGTT	180
TGTGTTACCT	CATAATCTTT	ACCGGCCTGC	TGGCTGAGCA	CTTAAACCTG	CTTTATCCAG	240
AACAGGCAAA	CCCGTTTTC	TGGCGACCAT	AGCGGTTTGG	AACCACCTGA	CTCCATCTCG	300
AACTCAGAAG	TGAAACAAAC	CCGCGCCGAT	GATAGTGTGG	AGTTTCTCC		349

(2) ANGABEN ZU SEQ ID NO: 56:

(i) SEQUENZKENNZEICHEN:

(A) LÄNGE: 321 Basenpaare

(B) ART: Nucleotid

(C) STRANGFORM: Einzelstrang

(D) TOPOLOGIE: linear

(ii) ART DES MOLEKÜLS: Genom-DNA

(iii) HYPOTHETISCH: NEIN

(vi) URSPRÜNGLICHE HERKUNFT:

(A) ORGANISMUS: *Legionella israelensis*

(B) STAMM: Bercovier-4

(C) INDIVIDUUM/ISOLAT: 36isr

(xi) SEQUENZBESCHREIBUNG: SEQ ID NO: 56:

GCCTTCCTCA	AGATGAGTTT	TCCCTTGAAG	CCCGTTGAAG	ACGACGACGT	TGATAGGCCGA	60
GGTGTGGAAG	CGCAGTAATG	TGTGAAGCTA	ACTCGTACTA	ATTGGCTGAT	TGTCTTGACC	120
ATATATCCTG	AAATCATTCA	GGGCATGATA	CAAATGAGT	TTAAACGCTT	GTGAATCAAA	180
CCCATTCAT	CTTTACCTTC	TGCCTTCAAT	AAGGCAGAAT	AACCCGTTTT	CCTGGCGACC	240
ATAGCTGTTT	GGTACCACCT	GATACCTTTC	CGAACTCAGT	AGTGAAACAA	ACACGCGCTG	300
ATGATAGTGT	GGGGTCTCCC	C				321

(2) ANGABEN ZU SEQ ID NO: 57:

(i) SEQUENZKENNZEICHEN:

(A) LÄNGE: 348 Basenpaare

(B) ART: Nucleotid

EP 0 739 988 A1

(C) STRANGFORM: Einzelstrang

(D) TOPOLOGIE: linear

(ii) ART DES MOLEKÜLS: Genom-DNA

(iii) HYPOTHETISCH: NEIN

(vi) URSPRÜNGLICHE HERKUNFT:

(A) ORGANISMUS: Legionella jordanis

(B) STAMM: BL-540

(C) INDIVIDUUM/ISOLAT: 38jor

(xi) SEQUENZBESCHREIBUNG: SEQ ID NO: 57:

GCCTCCCTCA AGATGAGTTT TCCCATGAAG CCCGTTGAAG ACTACGACGT TGATAGGCGA	60
GGTGTGGAAG CGCAGTAATG TGTGAAGCTA ACTCGTACTA ATTGGCTGAT TGTCTTGACC	120
ATATAACCTG AATGGCTTTT ATGTGGCAAG TCAAAGACAA GGCTTGGCAA GCTTGTGTTG	180
CCCTAATATT TATCTTTACC AGCCTGATGA ATGAATATCC CCTAACATGG GTATTTGCTC	240
AGCAGGACAA CGTTTTTCCT GCGCACCATA GCGGTTTGA ACCACCTGAC TCCATCTCGA	300
ACTCAGAAGT GAAACAGACC AGCGCCGATG ATAGTGTGAG GCTTCCTC	348

(2) ANGABEN ZU SEQ ID NO: 58:

(i) SEQUENZKENNZEICHEN:

(A) LÄNGE: 312 Basenpaare

(B) ART: Nucleotid

(C) STRANGFORM: Einzelstrang

(D) TOPOLOGIE: linear

(ii) ART DES MOLEKÜLS: Genom-DNA

(iii) HYPOTHETISCH: NEIN

(vi) URSPRÜNGLICHE HERKUNFT:

(A) ORGANISMUS: Legionella longbeachae sero.1

(B) STAMM: Long Beach-4

(C) INDIVIDUUM/ISOLAT: 39long1

(xi) SEQUENZBESCHREIBUNG: SEQ ID NO: 58:

GCCTCCCTCA AGATGAGTTT TCCCTTGAAG CCCGTTGAAG ACTACGACGT TGATAGGCAA	60
GGTGTGGAAG CGTAGTAATG CGTGAAGCTA ACTTGACTA ATTGGCTGAT TGTCTTGACC	120
ATATAATCTG AGTTACTTGA GATTATGCTT GATATAAGAT ATAATACCTC TTTATTTACC	180
TGAGTATCAT GCCAATAATG CGCGATACTC AAAACAGTTT TCCTGGCGAC TATAGCGGTT	240
TGGAACCACC TGAATCCATC TCGAACTCAG AAGTGAACG TACATGCGCC AATGATAGTG	300
TGAGGCTTCC TC	312

EP 0 739 988 A1

(2) ANGABEN ZU SEQ ID NO: 59:

(i) SEQUENZKENNZEICHEN:

- (A) LÄNGE: 312 Basenpaare
- (B) ART: Nucleotid
- (C) STRANGFORM: Einzelstrang
- (D) TOPOLOGIE: linear

(ii) ART DES MOLEKÜLS: Genom-DNA

(iii) HYPOTHETISCH: NEIN

(vi) URSPRÜNGLICHE HERKUNFT:

- (A) ORGANISMUS: Legionella lonbeachae sero.2
- (B) STAMM: Tucker-1
- (C) INDIVIDUUM/ISOLAT: 40long2

(xi) SEQUENZBESCHREIBUNG: SEQ ID NO: 59:

GCCTCCCTCA AGATGAGTTT TCCCTTGAAG CCCGTGAAG ACTACGACGT TGATAGGCAA	60
GGTGTGGAAG CGTAGTAATG CGTGAAGCTA ACTTGTACTA ATTGGCTGAT TGTCTTGACC	120
ATATAATCTG AGTTACTTTA GATTATGCTT GATATAAGAT ATAATACCTC TTTATTTACC	180
TGAGTATCAT GCCAATAATG CGCGATACTC AAAACAGTTT TCCTGGCGAC TATAGCGGTT	240
TGGAACCACC TGAATCCATC TCGAACTCAG AAGTGAAACG AACATGCGCC AATGATAGTG	300
TGAGGCTTCC TC	312

(2) ANGABEN ZU SEQ ID NO: 60:

(i) SEQUENZKENNZEICHEN:

- (A) LÄNGE: 354 Basenpaare
- (B) ART: Nucleotid
- (C) STRANGFORM: Einzelstrang
- (D) TOPOLOGIE: linear

(ii) ART DES MOLEKÜLS: Genom-DNA

(iii) HYPOTHETISCH: NEIN

(vi) URSPRÜNGLICHE HERKUNFT:

- (A) ORGANISMUS: Legionella machearchernii
- (B) STAMM: PX-1-G2-E2
- (C) INDIVIDUUM/ISOLAT: 4lmac

(xi) SEQUENZBESCHREIBUNG: SEQ ID NO: 60:

GCCTCCCTCA AGATGAGTTT TCCCATGAAG CCCGTGGAG ACTACGACGT TGATAGGCGA	60
GGTGTGGAAG CACAGTAATG TGTGTAGCTA ACTCGTACTA ATTGGCTGAT TGTCTTGACC	120
ATATAACCTG AGCTGCTTTT AGGTTGAAGA GTAAGTGATA AGGCAATACT TTAATTAAAG	180
GCATTAATGC CTAAGCGTTT GTGTTAACCT CTAACCCCTT TACCAAGCTG ATTGGCGAAT	240

# EP 0 739 988 A1

AGGCCAATCG GTAAACCACT TTCCTGGCG ACCATAGCGG TTGGAACCA CCTGAATCCA 300  
TCTCGAATC AGAAGTGAAA CAGACCTGCG CCAATGATAG TGTGGGGCTT CCCC 354

5

(2) ANGABEN ZU SEQ ID NO: 61:

(i) SEQUENZKENNZEICHEN:

10

- (A) LÄNGE: 374 Basenpaare
- (B) ART: Nucleotid
- (C) STRANGFORM: Einzelstrang
- (D) TOPOLOGIE: linear

15

(ii) ART DES MOLEKÜLS: Genom-DNA

(iii) HYPOTHETISCH: NEIN

(vi) URSPRÜNGLICHE HERKUNFT:

20

(A) ORGANISMUS: Legionella micdadei

(B) STAMM: Tatlock

(C) INDIVIDUUM/ISOLAT: 42micd

(xi) SEQUENZBESCHREIBUNG: SEQ ID NO: 61:

25

GAAGCCTCCC TCAAGATGAG TTTTCCCATG AAGCCCGTTG AAGACTACGA CGTTGATAGG 60  
CGAGGTGTGG AAGCACAGTA ATGTGTGTAG CTAACGTA CTAATTGGCT GATTGTCTTG 120  
ACCATATAAC CTGAAGTCC TTTAGTTAT GAGTGAAGAA GCAAGGCAAT ATTGAATGAC 180  
AGGGCAATGT AAATGCTCA GACAAATGAA TACAGAGTTT GTGTTAACCT CTATCCACTT 240  
TACCAAGCTG ATTGGTTAAT AGCCCAATCG GTAAACCAGG TTCCTGGCG ACTATAGCGG 300  
TTTGAACCA CCTGATCCCA TCTCGAATC AGAAGTGAAA CATACCTGCG CCAATGATAG 360  
TGTGGGGCTT CCCC 374

35

(2) ANGABEN ZU SEQ ID NO: 62:

(i) SEQUENZKENNZEICHEN:

40

- (A) LÄNGE: 340 Basenpaare
- (B) ART: Nucleotid
- (C) STRANGFORM: Einzelstrang
- (D) TOPOLOGIE: linear

45

(ii) ART DES MOLEKÜLS: Genom-DNA

(iii) HYPOTHETISCH: NEIN

(vi) URSPRÜNGLICHE HERKUNFT:

50

(A) ORGANISMUS: Legionella moravica

(B) STAMM: 316-36

(C) INDIVIDUUM/ISOLAT: 43monr

(xi) SEQUENZBESCHREIBUNG: SEQ ID NO: 62:

55

# EP 0 739 988 A1

5 GCCTCCCTCA AGATGAGTTT TCCCATGAAG CCCGTTGAAG ACTACGACGT TGATAGGCAG 60  
GGTGTGGAAG CGCAGTAATG TGTGAAGCTA ACTTGTTACTA ATTGGCTGAT TGTCTTGACC 120  
ATATAATCTG AGTTACTTCG GGTATAGAA GTAGACGATA AAATAGAGTA GAATGTGTGA 180  
CCTCGAATCT TTACCAGGCC TTGGGCTTGT TGATTGAACN CAATCATCAA TCTGAAGGTA 240  
AACAGTTTTC CTGGCGACAA TAGCGGTTTG GAACCACTTG ATCCCATCTC GAACTCAGAA 300  
10 GTGAAACGAA CATGCGCCGA TGATAGTGTG AGGCTTCCTC 340

## (2) ANGABEN ZU SEQ ID NO: 63:

### (i) SEQUENZKENNZEICHEN:

- 15 (A) LÄNGE: 302 Basenpaare  
(B) ART: Nucleotid  
(C) STRANGFORM: Einzelstrang  
(D) TOPOLOGIE: linear  
20 (ii) ART DES MOLEKÜLS: Genom-DNA  
(iii) HYPOTHETISCH: NEIN  
(vi) URSPRÜNGLICHE HERKUNFT:  
25 (A) ORGANISMUS: Legionella oakridgensis  
(B) STAMM: OR-10  
(C) INDIVIDUUM/ISOLAT: 44oak

### (xi) SEQUENZBESCHREIBUNG: SEQ ID NO: 63:

30 AGCCTCCCTC GAGATGAGTT TCCCATGAA GCCCGTTGAA GACGACGACG TTGATAGGCG 60  
AGGTGTGGAAG CGCTAGTAAT ACGTGAAGCT AACTCGTACT AATTGGCTGA TTGTCTTGAC 120  
CATATAACCT GAGTTGATTC AGGTTAAGCG ATGCGTTTGT GTATGCCTCA ATCTTTACCA 180  
35 CTTGGAAGCG TAAGCTTCCA ATACCGTTTT TCCTGGCGAC CATAGCCGTT TGAACCAACC 240  
TGATACCATC CCGAACTCAG AAGTGAACG AACGCGCGCC AATGATAGTG TGGGGCTTCC 300  
CC 302

## (2) ANGABEN ZU SEQ ID NO: 64:

### (i) SEQUENZKENNZEICHEN:

- 45 (A) LÄNGE: 323 Basenpaare  
(B) ART: Nucleotid  
(C) STRANGFORM: Einzelstrang  
(D) TOPOLOGIE: linear  
50 (ii) ART DES MOLEKÜLS: Genom-DNA  
(iii) HYPOTHETISCH: NEIN  
(vi) URSPRÜNGLICHE HERKUNFT:  
(A) ORGANISMUS: Legionella rubrilucens

55

EP 0 739 988 A1

(B) STAMM: WA-270A-C2

(C) INDIVIDUUM/ISOLAT: 45rub

5 (xi) SEQUENZBESCHREIBUNG: SEQ ID NO: 64:

	GCCTCCCTCA AGATGAGTTT TCCCATGAAG CCCGTTGAAG ACTACGACGT TGATAGGCGA	60
	GGTGTGGAAG CGCAGTAATG CGTGAAGCTA ACTCGTACTA ATTGGCTGAT TGTCTTGACC	120
10	ATATAACCTG ATACGCTTCA GGTATAGCA ATAACATGAA TGTGACTCTA TTYTTTACCG	180
	GCCTCATGGC CAGCGGTTAA CACCGTTGCC ACCATGACGC TTAACCGTT TTCCTGGCGA	240
	CCATAGCAGT CTGGAACCAC CTGAATCCAT CTCGAACTCA GAAGTGAAAC AGACTCGCGC	300
15	CGATGATAGT GTGAGGTTTC CTC	323

(2) ANGABEN ZU SEQ ID NO: 65:

(i) SEQUENZKENNZEICHEN:

20	(A) LÄNGE: 316 Basenpaare
	(B) ART: Nucleotid
	(C) STRANGFORM: Einzelstrang
	(D) TOPOLOGIE: linear

25 (ii) ART DES MOLEKÜLS: Genom-DNA

(iii) HYPOTHETISCH: NEIN

(vi) URSPRÜNGLICHE HERKUNFT:

	(A) ORGANISMUS: Legionella sainthelensis
30	(B) STAMM: Mt.St. Helens-4
	(C) INDIVIDUUM/ISOLAT: 46saint

(xi) SEQUENZBESCHREIBUNG: SEQ ID NO: 65:

35	GCCTCCCTCA AGATGAGTTT TCCCTTGAAG CCCGTTGAAG ACTACGACGT TGATAGGCAA	60
	GGTGTGGAAG CGTAGTAATG CGTGAAGCTA ACTTGACTA ATTGGCTGAT TGTCTTGACC	120
	ATATAATCTG AGTTACTTCA GATTGTGCTG AATATAAGAT ATAATGTTAC TCTCTTTATT	180
	TACCTGAGTA TCATGCGGCT AATGCACGAT ACTCAAACA GTTTTCCTGG CGACCATAGC	240
40	GGTTTGGTAC CACCTGATTC CATCTCGAAC TCAGAAGTGA AACGAACATG CGCCAATGAT	300
	AGTGTGAGGC TTCCTC	316

45 (2) ANGABEN ZU SEQ ID NO: 66:

(i) SEQUENZKENNZEICHEN:

	(A) LÄNGE: 350 Basenpaare
	(B) ART: Nucleotid
50	(C) STRANGFORM: Einzelstrang
	(D) TOPOLOGIE: linear

(ii) ART DES MOLEKÜLS: Genom-DNA

55

EP 0 739 988 A1

(iii) HYPOTHETISCH: NEIN

(vi) URSPRÜNGLICHE HERKUNFT:

(A) ORGANISMUS: *Legionella spiritensis*

(B) STAMM: Mt. St. Helens-9

(C) INDIVIDUUM/ISOLAT: 47spir

(xi) SEQUENZBESCHREIBUNG: SEQ ID NO: 66:

GCCTCCCTCA AGATGAGTTT TCCCA GAAG CCCGTTGAAG ACTACGACGT TGATAGGCCA	60
GGTGTGGAAG CGTAGTAATG CGTGAAGCTM ACTCGTACTA ATTGGCTGAT TGTCTTGACC	120
ATATAACCTG AATGACTTCG GGTATTGAT ACGAAAGATA CGAAAAGAAG CAAGAACGAT	180
TGTGTTACCG AATATCTCTT TACCAGCCTG TGGTGTGCCC TGAAGAAGAA ACAGGGTTAC	240
GACTCAGGAT AACCGTTTTT CTGGCGATTA TAGCCGTGTG GAACCACTG ATTCCATCTC	300
GAATCAGAA GTGAAACGCA CGTACGCCGA TGATAGTGTG GGGTCTCCCC	350

(2) ANGABEN ZU SEQ ID NO: 67:

(i) SEQUENZKENNZEICHEN:

(A) LÄNGE: 360 Basenpaare

(B) ART: Nucleotid

(C) STRANGFORM: Einzelstrang

(D) TOPOLOGIE: linear

(ii) ART DES MOLEKÜLS: Genom-DNA

(iii) HYPOTHETISCH: NEIN

(vi) URSPRÜNGLICHE HERKUNFT:

(A) ORGANISMUS: *Legionella steigerwaltii*

(B) STAMM: SC-18-C9

(C) INDIVIDUUM/ISOLAT: 48steig

(xi) SEQUENZBESCHREIBUNG: SEQ ID NO: 67:

GCCTCCCTCA AGATGAGTTT TCCCATGAAG CCCGTTGAAG ACTACGACGT TGATAGGCAA	60
GGTGTGGAAG CGCAGTAATG TGTGAAGCTA ACTTGTAATA ATTGGCTGAT TGTCTTGACC	120
ATATAATCTG AATTACTTCA GAGTGACTGA ATGTGTATAC AAGCTGTAGG TTGGCCAAGG	180
CACAACCTAC AGAAATAAAT TGTGAACCCCT TTATTTACCT AATGCATGAT TCGGGTATAA	240
TACGCCCAAC ATCATGTAAA ACCAGTTTTT CTGGCGACCA TAGCGGTTTG GAACCACTG	300
ACTCCATCTC GAACTCAGAA GTGAAACAGA CCCGCGCCAA TGATAGTGTG AGGTTTCCTC	360

(2) ANGABEN ZU SEQ ID NO: 68:

(i) SEQUENZKENNZEICHEN:

(A) LÄNGE: 366 Basenpaare

(B) ART: Nucleotid



# EP 0 739 988 A1

(C) STRANGFORM: Einzelstrang

(D) TOPOLOGIE: linear

5 (ii) ART DES MOLEKÜLS: Genom-DNA

(iii) HYPOTHETISCH: NEIN

(vi) URSPRÜNGLICHE HERKUNFT:

10 (A) ORGANISMUS: Legionella wadsworthii

(B) STAMM: 81-716A

(C) INDIVIDUUM/ISOLAT: 49wad

15 (xi) SEQUENZBESCHREIBUNG: SEQ ID NO: 68:

GCCTCCCTCA AGATGAGTTT TCCCTTGAAG CCCGTTGAAG ACTACGACGT TGATAGGCAA	60
GGTGTGGAAG CGCAGTAATG TGTGAAGCTA ACTTGACTA ATTGGCTGAT TGTCTTGACC	120
20 ATATAATCTG AGTTACTTCA GGTAACTGA TAAGTACGTA CGAATTAGAG ATTGGGTCTA	180
GGCCCAATCT AAAAAAATA AAAAAATGT AACCTTTTTA TTTACCTATA GCATGATTAG	240
GGTATAATAC GCCCAATTCA TCGGAAACCA GTTTTCCTGG CGACAATAGC GGCTTGAAC	300
25 CACCTGATCC CATCTCGAAC TCAGAAGTGA AACGAGCATG CGCCAATGAT AGTGTGAGGT	360
CTCCTC	366

## 30 Patentansprüche

1. Verfahren zur gattungsspezifischen Amplifikation von Nukleinsäuren der Gattung Legionella, dadurch gekennzeichnet, daß mit weniger als 7 Primern Nukleinsäuren aller möglichen Spezies der Gattung Legionella amplifiziert werden.
2. Verfahren zum Nachweis von Bakterien der Gattung Legionella in einer Probe gekennzeichnet durch
  - gattungsspezifische Amplifikation von Nukleinsäuren aller in der Probe vorhandenen Spezies der Gattung Legionella unter Verwendung eines Legionella-gattungsspezifischen Sets von wenigstens 7 Primern und
  - Nachweis einer oder mehrerer Spezies der Gattung Legionella aufgrund der Amplifikate.
3. Verfahren gemäß Anspruch 2, dadurch gekennzeichnet, daß zwischen den Spezies aufgrund der unterschiedlichen Größe der Amplifikate differenziert wird.
4. Verfahren gemäß Anspruch 2, dadurch gekennzeichnet, daß die Amplifikate anschließend mit einer gattungsspezifischen Sonde nachgewiesen werden.
5. Verfahren gemäß Anspruch 2, dadurch gekennzeichnet, daß die Amplifikate anschließend mit Hilfe speziesspezifischer Sonden auf die Anwesenheit von Legionella-Spezies untersucht werden.
6. Verfahren gemäß Anspruch 2, dadurch gekennzeichnet, daß die Amplifikate anschließend mit Hilfe von Legionella-Untergruppen spezifischer Sonden auf die Anwesenheit von Legionella-Untergruppen untersucht werden.
7. Verfahren zum Nachweis von Bakterien der Gattung Legionella unter gattungsspezifischer Amplifikation eines Teilstückes der Nukleinsäuresequenz der Bakterien, dadurch gekennzeichnet, daß das Teilstück sowohl Teile der 23S-Region und der 5S-Region, als auch die dazwischen liegende Spacerregion umfaßt.

EP 0 739 988 A1

8. Verfahren gemäß Anspruch 7, dadurch gekennzeichnet, daß die Amplifikation unter Verwendung zweier Primer durchgeführt wird, von denen einer mit einem Strang in der 23S-Region und der andere mit dem Gegenstrang in der 5S-Region hybridisiert.
- 5 9. Verfahren gemäß Anspruch 7, dadurch gekennzeichnet, daß die Primersequenzen Sequenzen enthalten, die ausgewählt sind aus mindestens 15 Basen langen Sequenzen, die zumindestens 90 % homolog mit oder komplementär zu Teilsequenzen der SEQ. ID. No. 1 sind.
- 10 10. Verfahren zum Nachweis von Bakterien der Gattung Legionella unter Verwendung einer Nukleinsäuresonde, welche eine mindestens 15 Basen lange Sequenz aufweist, die zumindestens 90 % homolog zu einem Teil der 23S- oder Spacer-Region der SEQ. ID. No. 1 ist, oder die zumindestens 90 % komplementär zu einem Teil der 23S- oder Spacer-Region der SEQ. ID. No. 1 ist.
- 15 11. Verfahren gemäß Anspruch 10, dadurch gekennzeichnet, daß die Sonde keine weiteren Legionella-spezifischen Sequenzen aufweist, die mehr als 15 Basen lang sind.
12. Verfahren gemäß Anspruch 10, dadurch gekennzeichnet, daß vor Verwendung der Nukleinsäuresonde ein Amplifikationsverfahren gemäß Anspruch 9 durchgeführt wird und die Sonde mit einem Strang des amplifizierten Teilstückes hybridisieren kann.
- 20 13. Verfahren zum Nachweis von Bakterien der Gattung Legionella, dadurch gekennzeichnet, daß die Summe aller möglichen Spezies der Gattung Legionella nachgewiesen wird.
- 25 14. Nukleinsäuresonde zum Nachweis von Bakterien der Gattung Legionella, welche zu mindestens 90 % homolog zu einem Teil der 23S- oder Spacer-Region der SEQ. ID. No. 1 ist, oder die zu mindestens 90 % komplementär zu einem Teil der 23S- oder Spacer-Region der SEQ. ID. No. 1 ist.
15. Sonde gemäß Anspruch 14 dadurch gekennzeichnet, daß sie gattungsspezifisch ist.
- 30 16. Sonde gemäß Anspruch 14, dadurch gekennzeichnet, daß der Teil von SEQ. ID. No. 1 zwischen den Positionen 94 und 126 oder 25 und 67 liegt.
17. Sonde gemäß Anspruch 14, dadurch gekennzeichnet, daß die Sequenz der Sonde die Sequenz von Position 94 und 126 oder 25 und 67 einschließt.
- 35 18. Paar von Primern zur gattungsspezifischen Amplifikation von Legionella-Nukleinsäuren von denen einer mit einem Strang in der 23S-Region und der andere mit dem Gegenstrang in der 5S-Region des Legionella-Genoms hybridisiert.
- 40 19. Doppelsträngige Legionella-spezifische Nukleinsäure enthaltend die Spacerregion zwischen 5S-RNS und 23S-RNS sowie jeweils nur solche Teile der 5S-RNS und 23S-RNS, die im Genom direkt an die Spacerregion anschließen, dadurch gekennzeichnet, daß sie höchstens 371 bp lang ist.
- 45 20. Reagenzkit zur gattungsspezifischen Amplifikation und zum speziesspezifischen Nachweis von Legionella-Spezies enthaltend
- ein gattungsspezifisches Set von weniger als 7 Primern und
  - mindestens eine Legionella-speziesspezifische Nachweis-Sonde.

Fig. 1

1: GCCTCCCTCAAGATGAGTTTTCCCATGAAGCCCGTTGAAGACTACGACGT  
51: TGATAGGCAAGGTGTGGAAGCGCAGTAATGCGTGAAGCTAACTTGTA  
23S/Spacer  
101: ATTGGCTGATTGTCCTTGACCATATAATCTGAGTGACTTCAGAA/TGTGATA  
151: TTGATTTGTATACGTGAAACGTATCGTGTAACCTCTGACTCTTTACCAA  
Spacer/5S  
201: CCTGTGGCTTAATATAGCAATCAAAGCCTCAGGTAAACCAGTTT/TCCTGG  
251: CGACTATAGCGATTTGGAACCACCTGATACCATCTCGAACTCAGAAGTGA  
301: AACATTTCCGCGCCAATGATAGTGTGAGGCTTCCTC

BNSDOCID: <EP 0739988A1>

FIG 3

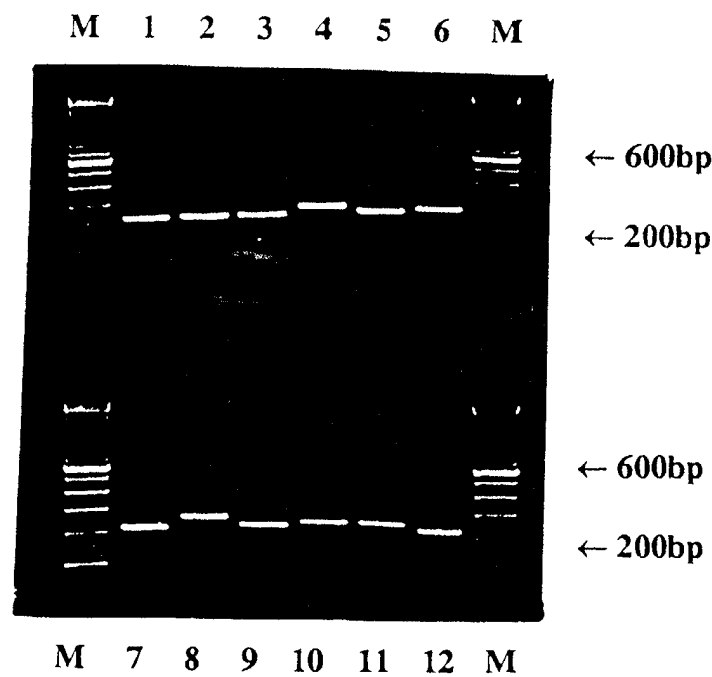


FIG 4

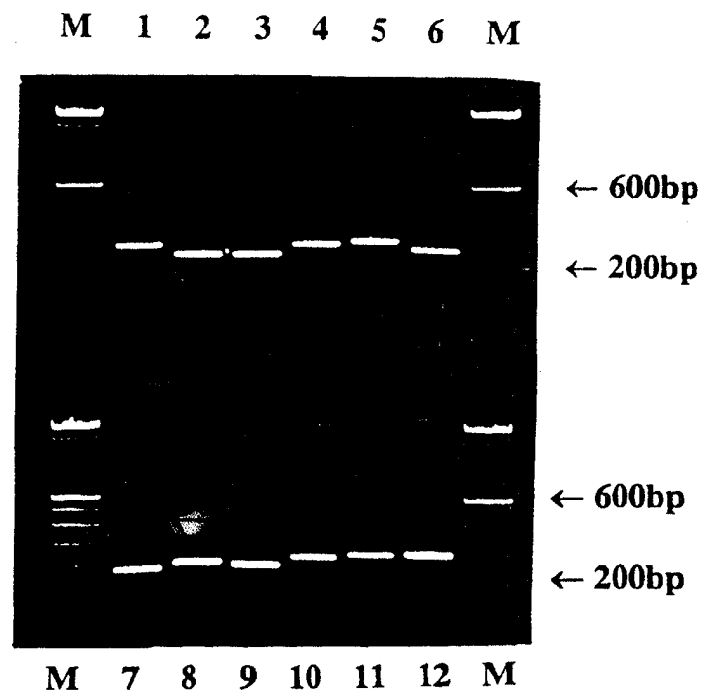
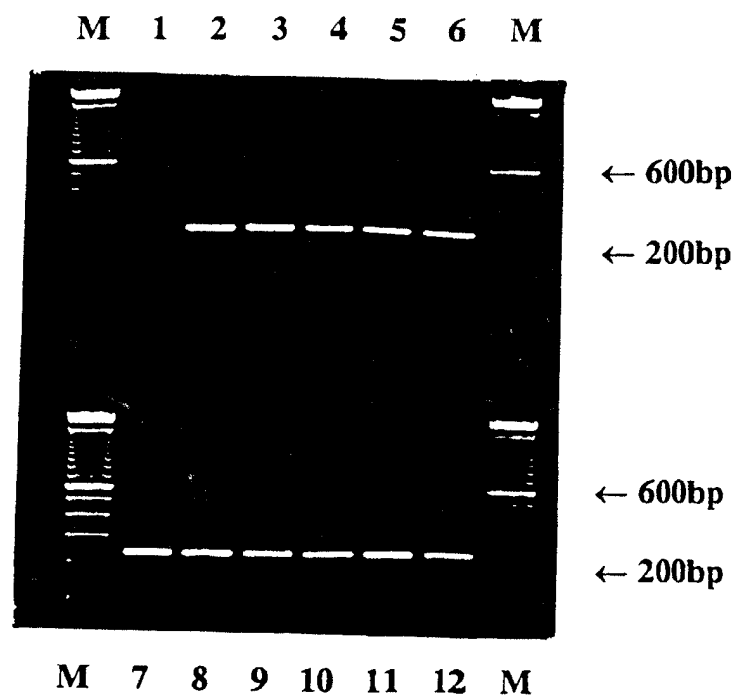


FIG 5





Europäisches  
Patentamt

# EUROPÄISCHER RECHERCHENBERICHT

Nummer der Anmeldung  
EP 96 10 6728

EINSCHLÄGIGE DOKUMENTE			
Kategorie	Kennzeichnung des Dokuments mit Angabe, soweit erforderlich, der maßgeblichen Teile	Betrifft Anspruch	KLASSIFIKATION DER ANMELDUNG (Int.Cl.6)
X	MOLECULAR AND CELLULAR PROBES, Bd. 8, Nr. 1, Februar 1994, Seiten 11-14, XP000578308 MAIWALD M ET AL: "Characterization of contaminating DNA in Taq polymerase which occurs during amplification with a primer set for Legionella 5S ribosomal RNA"	1,2	C12Q1/68 C12P19/34 C07H21/04
Y	* das ganze Dokument *	3-20	
X	J.CLIN. MICROBIOL., Bd. 32, Nr. 6, Juni 1994, Seiten 1503-5, XP000579096 MATSIOTA-BERNARD P ET AL: "Evaluation of commercial amplification kit for detection of Legionella pneumophila in clinical specimens"	1,2	
Y	* Seite 1504, Zeile 4 - Zeile 13 *	3-20	
X	CANADIAN JOURNAL OF MICROBIOL., Bd. 40, Nr. 6, Juni 1994, Seiten 495-9, XP000579140 OSHIRO R ET AL: "modification of reagents in the EnviroAmp™ kit to increase recovery of Legionella organisms in water "	1,2	RECHERCHIERTE SACHGEBIETE (Int.Cl.6) C12Q
Y	* das ganze Dokument *	3-20	
X	J. CLIN. MICROBIOL., Bd. 31, Nr. 12, Dezember 1993, Seiten 3325-28, XP000579097 KESSLER, H. ET AL.: "Rapid detection of Legionella species in Bronchoaveolar lavage fluids with the EnviroAmp Leginella PCR amplification and detection kit"	1,2	
Y	* das ganze Dokument *	3-20	
-/--			
Der vorliegende Recherchenbericht wurde für alle Patentansprüche erstellt			
Recherchenort DEN HAAG		Abschlußdatum der Recherche 19. August 1996	
		Prüfer Horne, H	
KATEGORIE DER GENANNTEN DOKUMENTE			
<p>X : von besonderer Bedeutung allein betrachtet  Y : von besonderer Bedeutung in Verbindung mit einer  anderen Veröffentlichung derselben Kategorie  A : technologischer Hintergrund  O : mündliche Offenbarung  P : Zwischenliteratur</p> <p>T : der Erfindung zugrunde liegende Theorien oder Grundsätze  E : älteres Patentedokument, das jedoch erst am oder  nach dem Anmeldedatum veröffentlicht worden ist  D : in der Anmeldung angeführtes Dokument  L : aus andern Gründen angeführtes Dokument  &amp; : Mitglied der gleichen Patentfamilie, übereinstimmendes  Dokument</p>			

EPO FORM 1503 03.92 (P04C03)





Europäisches  
Patentamt

# EUROPÄISCHER RECHERCHENBERICHT

Nummer der Anmeldung  
EP 96 10 6728

EINSCHLÄGIGE DOKUMENTE			
Kategorie	Kennzeichnung des Dokuments mit Angabe, soweit erforderlich, der maßgeblichen Teile	Betrifft Anspruch	KLASSIFIKATION DER ANMELDUNG (Int.Cl.6)
X	<p>CLI. LABOR., Bd. 40, Nr. 3, 1994, Seiten 211-16, XP000579246 HEIDRICH B ET AL: "Genetische Verwandtschaft innerhalb des Genus Legionella DNS Sequenzuntersuchung an ribosomalen Genen" * das ganze Dokument *</p>	1,2	
X	<p>EUR. J. MICROBIOL. INFECT. DIS.I, Bd. 13, Nr. 3, März 1994, Seiten 225-31, XP000579208 LISBY G ET AL: "Construction of a DNA amplification assay for the detection of Leginella species in clinical samples" * das ganze Dokument *</p>	1,2	
Y	<p>---</p>	3-20	
Y	<p>MED MICROBIOL LETT, Bd. 3, Nr. 6, 1994, Seiten 279-90, XP000579098 HEIDRICH B ET AL: "Automated direct sequencing of Leginella 5S RDNA" * das ganze Dokument *</p>	3-20	
Y	<p>WO-A-92 11273 ( F. HOFFMANN-LA ROCHE AG) * das ganze Dokument *</p>	3-20	
A	<p>WO-A-94 28174 (AMACO CORPORATION) * das ganze Dokument *</p>	1-20	
Der vorliegende Recherchenbericht wurde für alle Patentansprüche erstellt			
Recherchenort DEN HAAG		Abschlußdatum der Recherche 19. August 1996	
		Prüfer Osborne, H	
<p>KATEGORIE DER GENANNTEN DOKUMENTE</p> <p>X : von besonderer Bedeutung allein betrachtet Y : von besonderer Bedeutung in Verbindung mit einer anderen Veröffentlichung derselben Kategorie A : technologischer Hintergrund O : nichtschriftliche Offenbarung P : Zwischenliteratur</p> <p>T : der Erfindung zugrunde liegende Theorien oder Grundsätze E : älteres Patentdokument, das jedoch erst am oder nach dem Anmeldedatum veröffentlicht worden ist D : in der Anmeldung angeführtes Dokument L : aus andern Gründen angeführtes Dokument &amp; : Mitglied der gleichen Patentfamilie, übereinstimmendes Dokument</p>			

EPO FORM 1503 03.82 (P04C03)